

Aus dem Institut für Humangenetik  
(komm. Direktorin: PD Dr. med. Almuth Caliebe)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Screening nicht-neoplastischer lymphatischer Gewebe zur  
Identifikation prämaligner B-Zellen mit *MYC*-Translokation bei  
Kindern**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Pelin Kurnaz aus Kiel

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Eva Maria Murga Penas, Institut für Humangenetik
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Marc-Philip Hitz, Klinik für angeborene Herzfehler und  
Kinderkardiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 04.09.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Grundlagen der Tumorentstehung und ihre Prävalenz.....	1
1.2	Entstehung hämatologischer Neoplasien.....	2
1.2.1	Grundlagen des lymphatischen Systems.....	2
1.2.2	Zelluläre Grundlagen einer adaptiven Immunantwort.....	4
1.2.3	Molekulare Grundlagen einer adaptiven Immunantwort.....	5
1.2.4	Genetische Grundlagen der Antikörpervielfalt .....	6
1.3	Klassifikation und Pathogenese der malignen Lymphome.....	8
1.3.1	Entstehung rekurrenter genetischer Veränderungen in B-Zell-Lymphomen.....	9
1.3.2	Das Burkitt-Lymphom (BL) und klinische Varianten .....	12
1.3.3	Genetische Veränderungen beim BL.....	14
1.4	Ziele und Fragestellungen.....	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>16</b>
2.1	Probenmaterial.....	16
2.1.1	Material für Kontrolluntersuchungen.....	16
2.1.2	Patientenkollektiv für das Screening zur Untersuchung der t(8;14)/MYC-IGH.....	18
2.2	Geräte und Software.....	21
2.3	Reagenzien und Lösungen .....	21
2.4	Puffer und Lösungen.....	22
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>24</b>
3.1	Etablierung eines Vier-Farb-FISH-Assays.....	24
3.2	Sondenfällung für FISH.....	27
3.3	FISH Verdau.....	29
3.4	FISH-Hybridisierung.....	30
3.5	Vorbehandlung für FISH an Paraffin.....	31
3.6	FISH an Paraffinschnitten.....	32
3.7	Auswertung FISH .....	33
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
4.1	Etablierung des Vier-Farb-FISH-Assays an Kontrollproben .....	35
4.1.1	Ermittlung/Berechnung der Nachweisgrenzen an negativen Kontrollproben.....	35
4.1.2	Validierung des Vier-Farb-FISH-Assays an positiven Kontrollproben.....	37

4.2	Anwendung des Vier-Farb-FISH-Assays an den ausgewählten Proben gesunder Probanden .....	40
4.2.1	Vorkommen und Interpretation abweichender Signalkonstellationen an den ausgewählten Proben gesunder Probanden.....	48
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
5.1	Methodische Aspekte.....	55
5.2	Biologische Bedeutung des Screeningergebnisses und ihr Beitrag zum Verständnis der Lymphom-Pathogenese des sBL.....	57
5.2.1	Die t(8;14)(q24;q32)/ <i>MYC-IGH</i> -Fusion in gesunden und immunkompromit-tierten Individuen.....	58
5.2.2	Die t(14;18)(q32;q21)/ <i>IGH-BCL2</i> -Fusion in gesunden Individuen.....	59
5.2.3	Die t(9;22)(q34;q22)/ <i>ABL-BCR</i> -Fusion und <i>MLL</i> -Translokationen in pädiatrischen gesunden Individuen.....	60
5.2.4	Biologische Bedeutung chromosomaler Aberrationen in gesunden Individuen.....	62
5.3	Interpretation des Ergebnisses unter Berücksichtigung des zeitlich-örtlichen Zusammenhangs zwischen Translokation und Krankheitsmanifestation.....	63
5.4	Interpretation des Ergebnisses unter Berücksichtigung der Eigenschaften des <i>MYC</i> -Protoonkogens .....	66
5.5	Fazit.....	70
5.6	Ausblick.....	71
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>87</b>

## I Abkürzungen

AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom ( <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> )
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BAP	Bruchpunkt-flankierende Sonden ( <i>Break Apart Rearrangement Probe</i> )
BL	Burkitt-Lymphom
$C_H$	<i>Constant</i> -Region des <i>IGH</i> -Locus
CML	chronische myeloische Leukämie
$D_H$	<i>Diversity</i> -Region des <i>IGH</i> -Locus
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom ( <i>diffuse large B-cell lymphoma</i> )
eBL	endemisches Burkitt-Lymphom
EBV	Epstein-Barr-Virus
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FL	Follikuläres Lymphom
H-Kette	Schwerkette ( <i>heavy chain</i> )
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin-Lymphom
IDZ	interdigitierende dendritische Zelle
Ig	Immunglobulin (Protein)
<i>IG</i>	Immunglobulin (Gen)
<i>IGH</i>	Immunglobulinschwerketten-Locus ( <i>immunoglobulin heavy chain gene</i> )
<i>IG<math>\kappa</math></i>	Immunglobulinleichtketten-Locus Kappa ( <i>immunoglobulin light chain gene <math>\kappa</math></i> )
<i>IG<math>\lambda</math></i>	Immunglobulinleichtketten-Locus Lambda ( <i>immunoglobulin light chain gene <math>\lambda</math></i> )
$J_H$	<i>Joining</i> -Region des <i>IGH</i> -Locus
Kb	Kilobasenpaare
M	Molar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MRD	Minimale Resterkrankung ( <i>minimal residual disease</i> )
mRNA	messenger RNA
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

## Abkürzungen

---

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NWG	Nachweisgrenze
pB	peripheres Blut
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PTLD	Post-Transplantations-lymphoproliferative Erkrankung ( <i>posttransplant lymphoproliferative disorder</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
sBL	sporadisches Burkitt-Lymphom
TH-Zelle	T-Helfer-Lymphozyt
UpM	Umdrehungen pro Minute
$V_H$	<i>Variable</i> -Region des <i>IGH</i> -Locus
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
ZfKR	Zentrum für Krebsregisterdaten

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Grundlagen der Tumorentstehung und ihre Prävalenz

Krebs bezeichnet eine Gruppe heterogener Erkrankungen, die auf Basis genetischer Veränderungen entstehen. Dabei handelt es sich um bösartige Neubildungen (Neoplasien) von Zellen und Geweben, auch Malignome genannt. Demgegenüber bezeichnet der allgemeinere Begriff Geschwulst (Tumor) eine Gewebsvermehrung jeder Art (Brandt and Petrides, 2014). Ein Tumor kann gutartig (benigne), *borderline*-, also an der Grenze zwischen Gutartigkeit und Bösartigkeit, oder bösartig (maligne) sein. Maligne Tumore zeichnen sich im Gegensatz zu benignen Tumoren durch bestimmte Merkmale ihrer Tumorzellen aus, die sie zu Überleben, Vermehrung (Proliferation) und Streuung (Metastasierung) befähigen und als ‚*Hallmarks of Cancer*‘ bezeichnet werden (Hanahan and Weinberg, 2000). Dabei handelt es sich um Merkmale, die Tumorzellen im Laufe ihrer Tumorgenese allmählich akquirieren wie die Fähigkeit zur unabhängigen Proliferation durch Wachstumssignale, Resistenz gegen Wachstumsinhibitoren und Umgehen des natürlichen programmierten Zelltodes (Apoptose). Darüber hinaus können sie ihre Erbinformation unbegrenzt vervielfältigen sowie die Bildung von Blutgefäßen induzieren und besitzen die Fähigkeit, in Gewebe einzudringen und zu metastasieren (Hanahan and Weinberg, 2000). Diese anfangs sechs Merkmale wurden durch neue Erkenntnisse um mehrere Merkmale ergänzt (Hanahan and Weinberg, 2011). Zum einen sind Tumorzellen fähig, ihren Energiemetabolismus umzuprogrammieren, um Energie für Zellteilungs- und Wachstumsprozesse zur Verfügung zu stellen. Zum anderen besitzen sie Mechanismen, um aktiv der Erkennung und Zerstörung durch Immunzellen auszuweichen.

Eine Tumorerkrankung kann als genetische Erkrankung gedeutet werden, denn ursächlich für den Erwerb dieser Merkmale ist eine genomische Instabilität der Tumorzellen, die zu Mutationen führt (Grivennikov et al., 2010). Aber auch epigenetische Mechanismen wie aberrante DNA-Methylierungsmuster und Histon-Modifikationen können zu einer veränderten Genexpression führen, die die Entstehung von Tumoren fördert (Esteller, 2007; Berdasco and Esteller, 2010). Daneben modifizieren diverse durch das Immunsystem getragene Entzündungsreaktionen das Mikromilieu des Tumors. Hierunter verbirgt sich, dass bei Entzündungsreaktionen vornehmlich des angeborenen Immunsystems unter anderem Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden oder reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die mutagene

Wirkung auf das Genom haben können, entstehen (Grivennikov et al., 2010). Neuere Erkenntnisse haben außerdem gezeigt, dass ein Tumor nicht nur aus den Tumorzellen im eigentlichen Sinne besteht, sondern scheinbar normale Zellen des Tumor-assoziierten Stromas zur Ausprägung der Tumormerkmale beitragen (Hanahan and Weinberg, 2011). Die genauen Mechanismen, die den einzelnen Merkmalsausprägungen unterliegen, können sich sogar innerhalb einer einzelnen Tumorentität sehr voneinander unterscheiden.

Krebs ist eine seltene Erkrankung. In Deutschland werden auf Bundesebene die epidemiologischen Daten derartiger Neoplasien im Falle der Erwachsenen durch das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKR) zusammengeführt, während kindliche maligne Neoplasien durch das Deutsche Kinderkrebsregister erfasst werden. Das ZfKR schätzte im Jahr 2011 circa 480.000 neu diagnostizierte Tumore unter den Erwachsenen (Krebs gesamt, [www.krebsdaten.de/](http://www.krebsdaten.de/). Zugegriffen am 13.Juli 2015), während das Deutsche Kinderkrebsregister im Jahr 2013 2051 Fälle verzeichnete (Deutsches Kinderkrebsregister Jahresbericht 2013/14, [www.kinderkrebsregister.de/](http://www.kinderkrebsregister.de/). Zugegriffen am 13.Juli 2015).

## **1.2 Entstehung hämatologischer Neoplasien**

### **1.2.1 Grundlagen des lymphatischen Systems**

Je nach Herkunft von Geweben aus den drei Keimblättern können epitheliale Tumore (aus dem Ektoderm und Entoderm) von mesenchymalen Tumoren (aus dem Mesoderm) und Teratomen (aus pluripotenten Keimzellen) unterschieden werden. Nicht zuletzt führen embryonale Fehlentwicklungen zu embryonalen Tumoren (Bühling et al., 2008). Tumore werden grundsätzlich als solide bezeichnet, wenn sie sich inform von Hirntumoren, Neuroblastomen, renalen oder hepatischen Tumoren, Knochentumoren oder Tumoren des Weiteils manifestieren. Demgegenüber stehen die hämatologischen Neoplasien, die das Blut und blutbildende System betreffen. Die kontinuierliche Neubildung der Blutbestandteile findet nach der Geburt im Knochenmark statt. Dort sind multipotente hämatopoetische Stammzellen ansässig. Diese hämatopoetischen Stammzellen werden über komplexe Regulationsmechanismen in unterschiedliche Differenzierungswege eingespeist. Dabei lässt sich grob die Lymphopoese von der Myelopoese unterscheiden. Während der Myelopoese reifen aus myeloischen Vorläuferzellen, Progenitorzellen



genannt, die reifen Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten sowie Monozyten. Granulozyten und Monozyten sind die Hauptakteure der angeborenen (natürlichen) Immunabwehr. Aus der Lymphopoese gehen die Zellen für die adaptive (erworbene) Abwehr hervor. Sie lassen sich in der Reihenfolge ihres Auftretens in T-Lymphozyten (ca. 75%), B-Lymphozyten (ca. 15%) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (ca. 10%) funktionell einordnen, wobei letztere der angeborenen Abwehr zugerechnet werden (Lüllmann-Rauch, 2009).

B- und T-Zellen reifen an unterschiedlichen Orten, die primäre lymphatische Organe genannt werden, heran. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark (B für *bone marrow*). Aus ihnen werden später Plasmazellen, die Antikörper sezernieren und somit die humorale Immunabwehr repräsentieren. Die T-Lymphozyten reifen im Thymus. Sie bilden zwei distinkte Populationen aus: die T-Helfer-Lymphozyten (TH-Zellen) und die zytotoxischen Lymphozyten. Beide stehen für die Zell-vermittelte Immunabwehr.

Am Ende der Lymphopoese gelangen die immunkompetenten, als naiv bezeichneten Lymphozyten in die Blutbahn und besetzen die sekundären lymphatischen Organe. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen die Lymphknoten, die Milz und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe, das weiter in das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe aufgeschlüsselt werden kann. Unter dem Einfluss von Chemokinen aus dem lymphatischen Stroma bilden sich in den lymphatischen Organen typischerweise B- und T-Zonen aus, in die die jeweiligen Lymphozyten dirigiert werden. Die B-Zone imponiert in Form von Lymphfollikeln eindrucksvoll, während die T-Zonen histologisch eher unspezifisch sind und sich hier die postkapillären Venolen, auch hoch-endotheliale Venolen genannt, befinden. Lymphozyten sind einer ständigen Rezirkulation zwischen dem Blut und den lymphatischen Organen beziehungsweise dem Interstitium unterworfen. Im Blut selbst hält sich ein nur geringer Anteil von 2% der Lymphozyten über kurze Zeit auf, bis diese bevorzugt in den postkapillären Venolen aus dem Blut ausströmen (Lüllmann-Rauch, 2009).

Da sich die folgende Arbeit speziell mit lymphatischen Neoplasien befasst, wird auf solche Mechanismen eingegangen werden, die für die Lymphomentstehung relevant sind. Da die neoplastischen Zellen in ihrer Zytologie, ihrem Immunphänotyp und ihrer proliferativen Aktivität sehr ihren physiologischen Ursprungszellen gleichen und die Beurteilung der Architektur der Tumorzellen mitsamt des begleitenden zellulären Mikromilieus eine meist eindeutige Typisierung der Lymphomentität liefert, bildet die Kenntnis über die physiologische B-Zell-Reifung die Grundlage für das Verständnis der Lymphome

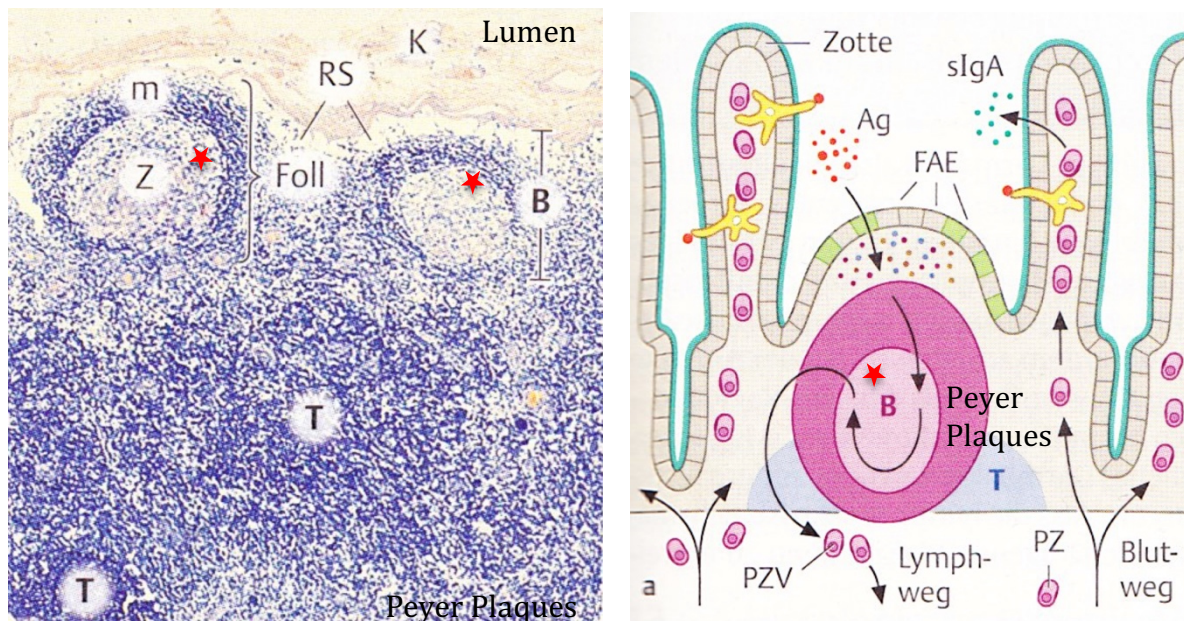
(Coupland et al., 2000a). In den folgenden Kapiteln werden die physiologischen Prozesse der Lymphozytenreifung und Antikörperbildung erläutert.

### 1.2.2 Zelluläre Grundlagen einer adaptiven Immunantwort

Um die Vorgänge während einer Immunantwort verstehen zu können, sollte man eine weitere Zellart kennen, nämlich die dendritische Zelle (DC für *dendritic cell*). Die DC sind Zellen, die die Epithelien und das Interstitium des menschlichen Körpers besiedeln. Kommen die DC mit Pathogenen in Kontakt, phagozytieren sie diese und wandern in nahe gelegene lymphatische Gewebe, wo sie sich als interdigitierende dendritische Zelle (IDZ) in den T-Zonen niederlassen. Während ihrer Wanderung prozessieren sie die Pathogene und exponieren verschiedene Fragmente des jeweiligen Pathogens an ihren Außenrezeptoren, den Haupthistokompatibilität Klasse II-Rezeptoren (MHC-Klasse II-Rezeptoren, MHC aus dem englischen *Major Histocompatibility Complex*). T-Lymphozyten, die aus den hochendothelialen Venolen in das lymphatische Gewebe austreten, kommen so mit den an der Oberfläche der IDZ gebundenen Antigenfragmenten in Kontakt. Aufgrund dieser Eigenschaft werden DC Antigen-präsentierende Zellen genannt. Neben den IDZ gibt es follikuläre dendritische Zellen, die ohne vorhergehende Antigenprozessierung den B-Lymphozyten Antigene in den Lymphfollikeln präsentieren (Lüllmann-Rauch, 2009).

T- und B-Lymphozyten besitzen an ihrer Außenmembran Rezeptoren, die spezifisch ein Antigen binden können. Trifft beispielsweise eine T-Zelle an einer IDZ auf ein passendes Antigen, wird sie aktiviert und proliferiert stark. B-Zellen, die auf ein passendes Antigen an den follikulären DC stoßen, nehmen das Antigen auf und exponieren Fragmente hiervon ähnlich einer Antigen-präsentierenden Zelle an ihrer Außenmembran. Während einer Infektion dominiert meist ein bestimmtes Antigen. So ist es wahrscheinlich, dass eine T-Zelle, die zuvor durch dasselbe Antigen aktiviert worden ist, in der T-Zone auf eine B-Zelle trifft und durch die Zell-Zell-Interaktion beide Zellen wechselseitig aktiviert werden. Aktivierte B-Zellen wandern in die Lymphfollikel und transformieren in stark proliferierende Zentroblasten. Es entstehen zahlreiche Tochterzellen, die in die Lage versetzt werden, für das dargebotene Antigen spezifische, hoch-affine Antikörper zu bilden. Wird in einem lymphatischen Gewebe eine Immunantwort ausgelöst, so imponieren die Lymphfollikel histologisch durch die Ausbildung von Keimzentren, die als

Sekundärfollikel bezeichnet werden. In diesen wird eine helle von einer dunklen Zone unterschieden. In der dunklen Zone proliferieren die Zentroblasten stark. In der hellen Zone differenzieren die Zentroblasten in Zentrozyten. Während sich die Zentroblasten teilen, werden die übrigen Zellen des Lymphfollikels unter Ausbildung eines dunklen Randsaums, dem Follikelmantel, verdrängt (Coupland et al., 2000a; Lüllmann-Rauch, 2009).



**Abbildung 1.1: Architektur lymphatischer Gewebe.** Links: Histologisches Präparat eines Lymphknotens: Anschnitt zweier Sekundärfollikel (Foll) mit Keimzentrum (Z) und Lymphozytenmantel (m). Sie repräsentieren die B-Zone (B). Die T-Zone (T) enthält gleichmäßig verteilte Lymphozyten. Rechts: Schematische Darstellung der Ileum-Schleimhaut: Sichtbar ist ein Sekundärfollikel (B-Zone), dicht benachbart die T-Zone. Das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) ist kuppelartig vorgewölbt und wird als Domepithel bezeichnet. Das Domepithel enthält keine Zotten oder Krypten. Mit Sternchen markiert sind die Orte des Klassenwechsels (Es wurden lediglich die wichtigsten Strukturen genannt) (modifiziert nach Lüllmann-Rauch, 2009).

## 1.2.3 Molekulare Grundlagen einer adaptiven Immunantwort

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, können als membranständige Rezeptoren den B-Zellen dabei helfen, Antigene zu erkennen. Sie haben dieselbe Antigen-bindende Eigenschaft wie der entsprechend lösliche Antikörper. Werden sie als lösliche Antikörper von Plasmazellen sezerniert, können sie Pathogene auf verschiedene Weise unschädlich machen: durch Binden und Neutralisieren von Bakterien, bakteriellen Toxinen und Viren, durch Komplementaktivierung oder Opsonierung von Mikroorganismen (Rassow, 2008). Antikörper setzen sich aus zwei identischen langen Schwereketten (H-Kette aus dem englischen *heavy chain*) und zwei identischen kurzen Leichtketten (L-Kette aus dem englischen *light chain*) zusammen. Disulfidbrücken verbinden die Ketten miteinander

und bilden auch innerhalb einer Kette Quervernetzungen aus. Die H-Kette definiert die Antikörperklasse und den Subtyp des Antikörpers. Es gibt fünf Antikörperklassen – IgM, IgD, IgA, IgE und IgG –, davon besitzen das IgA zwei und das IgG vier Subtypen. Mit diesen Antikörperklassen und ihren Subtypen können L-Ketten kombiniert werden. Dabei unterscheidet man zwei Typen von L-Ketten: den  $\lambda$ - (Lambda) und den  $\kappa$ -Typ (Kappa). Der *IGH*-Locus befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 14, die Gene für die leichten Ketten sind im Falle des  $\kappa$ -Typs auf dem Chromosom 2 und im Falle des  $\lambda$ -Typs auf dem Chromosom 22 (Willis and Dyer, 2000; Rassow, 2008). Elektronenmikroskopisch stellen sich Antikörper als Y-förmige Strukturen dar. An den beiden oberen Enden der Y-Struktur sind identische variable Domänen lokalisiert, welche die antigenbindende Domäne darstellen. Neben ihrer variablen Domäne besitzen L-Ketten eine weitere konstante Domäne und die H-Ketten je nach Antikörperklasse drei bis vier konstante Domänen (Rassow, 2008).

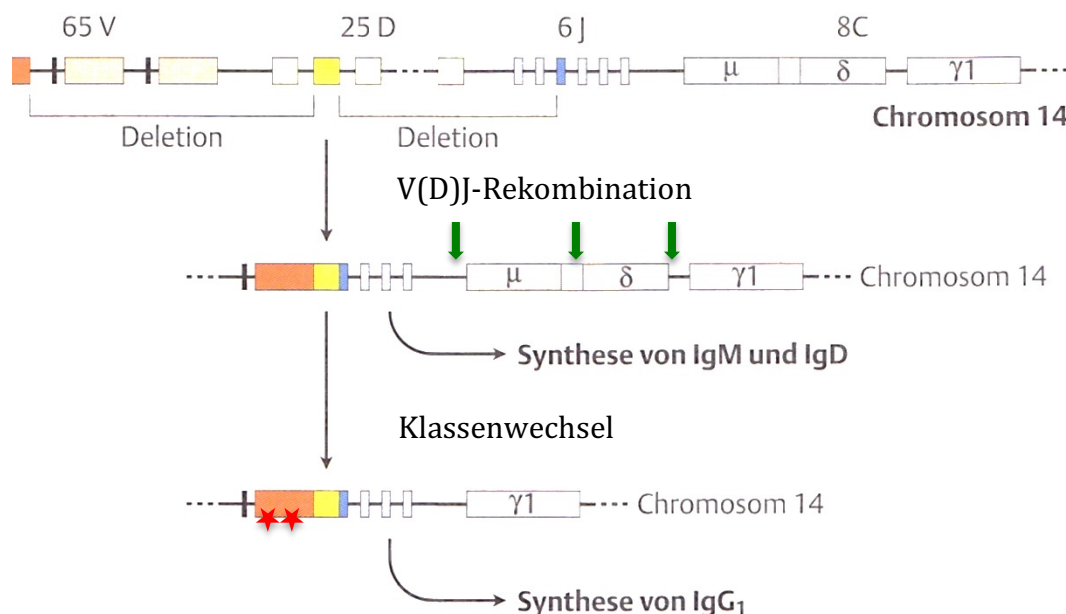
### 1.2.4 Genetische Grundlagen der Antikörpervielfalt

Während einer Immunantwort geht eine enorme Vielfalt an Antikörpern hervor, die in dem Mechanismus der somatischen Rekombination begründet liegt. Dabei werden Gensegmente, die für das Immunglobulingen (*IG*-Gen) kodieren, neu kombiniert. Dies nimmt bereits in den Progenitor-B-Zellen im Knochenmark ihren Ausgang.

Das Gen für die Schwereketten des Ig (*IGH*) liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 14 (14q32). Hier werden nach dem Zufallsprinzip jeweils ein Gensegment aus circa 65  $V_H$ -, 25  $D_H$ - und 6  $J_H$ - Gensegmenten (V für *variable*, D für *diversity*, J für *joining*) neu zusammengelagert, die restlichen Gensegmente werden deletiert. Dieser Prozess ist als V(D)J-Rekombination oder (D)J-Rearrangement bekannt (Rajewsky, 1996). Ein erfolgreiches V(D)J-Rearrangement ist durch den Nachweis von  $Ig\mu$ , der Schwereketten des Immunglobulins IgM, im Zytosol erfassbar. Nach ähnlichem Muster verläuft die Umlagerung der Ig-Leichtkettengene  $\kappa$  (*IGK*) und  $\lambda$  (*IGL*). Die Zusammenlagerung von Leicht- und Schwereketten führt zu einem kompletten Ig vom Typ M, welches eine Transmembrandomäne aufweist. Dieses Ig ist membranständig und erkennt als B-Zell-Rezeptor im eigentlichen Sinne Antigene. Für den konstanten Teil der Ig-Schwereketten, der die Antikörperklasse und den Subtyp bestimmt, kodieren 8 C-Gensegmente (C für *constant*). Zunächst enthält der *IGH*-Locus alle für die konstanten Ig-Domänen kodierenden Gensegmente, die B-Zelle exprimiert hiervon IgM. Die Genabschnitte für die

konstanten Teile der Immunglobuline IgM und IgD werden in ein gemeinsames Transkriptionsprodukt, der mRNA, umgeschrieben, sodass diese beiden Ig-Klassen durch alternative Splicingverfahren zeitgleich auftreten können. Dies zeigt sich durch Koexpression von membrangebundenem IgM und IgD bei der reifen, naiven B-Zelle (Liu et al., 1980; Küppers and Dalla-Favera, 2001; Rassow, 2008).

Kommt ein B-Lymphozyt an einem peripheren lymphatischen Organ nun in Kontakt mit einem Antigen, differenziert er in eine Gedächtnis-B-Zelle oder eine langlebige Plasmazelle. Insbesondere bei der Differenzierung zur Plasmazelle erfolgt ein Klassenwechsel (*class switch*). Dabei werden die nicht benötigten C-Gensegmente deletiert und die Plasmazelle kann von nun an unwiederruflich ein Ig einer einzigen Klasse und eines Subtyps bilden (Cory et al., 1980; Küppers and Dalla-Favera, 2001; Rassow, 2008). Auf diese Weise dominiert im Verlauf einer Immunantwort zunächst die Produktion von Antikörpern der Klassen IgM und IgD, später entstehen durch *class switch* IgG, IgE und IgA. Sowohl die Plasmazelle als auch die Gedächtniszelle verlassen am Ende ihrer B-Zelldifferenzierung das Keimzentrum, um als Plasmazelle vornehmlich das Knochenmark beziehungsweise als Gedächtniszelle die an die Mantelzone angrenzende Marginalzone zu besiedeln.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des physiologischen *IGH*-Rearrangements.** Die V(D)J-Rekombination, Klassenwechsel an *switch* Regionen (mit Pfeil markiert) und somatische Hypermutation. Die Sterne markieren Bereiche somatischer Hypermutation. Hiervon sind die variablen und benachbarten Regionen am stärksten betroffen. V: variable region, D: diversity region, J: joining region, C: constant region. (modifiziert nach Rassow, 2008)

Durch die Kombination einer H-Kette mit einem der beiden Typen der L-Kette, die ihrerseits eine somatische Rekombination von alternativen Gensegmenten erfährt,

entsteht bereits eine große Variabilität der Antikörper. Diese wird erhöht, indem bei der Kombination der Gensegmente Nukleotide in die DNA inseriert oder aber deletiert werden. Ebenso führen somatische Hypermutationen während der Keimzentrumsreaktion zu einer Erhöhung der Antikörpervielfalt und -affinität, indem in die für den variablen Teil der Antikörper kodierenden Genabschnitte Mutationen eingefügt werden (Rassow, 2008). In den Keimzentren werden B-Zellen mit besonders starker Bindung an das Antigen selektioniert und die übrigen der Apoptose zugeführt (Küppers and Dalla-Favera, 2001; Lüllmann-Rauch, 2009; Stein et al., 2007).

### 1.3 Klassifikation und Pathogenese der malignen Lymphome

Grundsätzlich können alle Zellen des lymphatischen Systems entarten. Bösartige Neoplasien, die das lymphatische System betreffen, werden in der Regel Lymphome genannt. Lymphome entstehen, wenn sich während der Reifung der Lymphozyten genetische Unfälle ereignen. Die entstandenen genetischen Veränderungen führen zur Deregulation des betroffenen Gens oder der betroffenen Gene aufgrund chromosomaler Translokationen, Deletionen, Insertionen, Amplifikationen, Duplikationen und/oder Mutationen. Die Veränderungen können die Zellhomöostase in Richtung einer Wachstums- und Proliferationssteigerung oder aber einer Hemmung der Apoptose beeinflussen (Stein et al., 2007).

Meist sind bei den veränderten Genen Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene betroffen. Protoonkogene sind Gene, die unter physiologischen Bedingungen für Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, Wachstumsrezeptoren und Apoptoseregulatoren kodieren (Croce, 2008). Genetische Veränderungen von Protoonkogenen können in einer Aktivierung von Wachstum induzierenden Onkogenen resultieren. Bekannte Protoonkogene sind die Onkogene *MYC*, *RAS* und *RAF*. Tumorsuppressorgene unterdrücken in gesunden Zellen ein unkontrolliertes Wachstum, indem sie an der Regulation des Zellzyklus sowie der Apoptose beteiligt sind. Beispiele sind die *RB1*- und *TP53*-Gene (Hanahan and Weinberg, 2011).

Maligne Lymphome gehen von einem einzelnen in derartiger Weise transformierten Lymphozyten hervor. So enthalten die Tumorzellen der B-Zell-Lymphome beispielsweise alle dieselben Gensequenzen ihrer *IG*-Loci, was bedeutet, dass sie alle von einer einzelnen identisch umgelagerten Prä-B-Zelle abstammen. Sie bilden einen Klon, welches in dem Begriff der Monoklonalität wiedergegeben wird. Hingegen werden normale B-Zellen, die

alle unterschiedliche Sequenzen ihrer *IGH*- und *IGκ/IGλ*-Loci aufweisen, als polyklonal bezeichnet (Coupland et al., 2000b).

Neben der Bestimmung der Klonalität, werden hämatologische Neoplasien anhand ihrer Klinik und Morphologie, ihres Immunphänotyps (Oberflächenmerkmale) und genetischer Merkmale klassifiziert.

Die malignen Lymphome werden historisch betrachtet in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (HL und NHL) unterschieden (Stein et al., 2007). Die NHL stellen eine große Gruppe verschiedener Lymphomentitäten dar. Die Klassifikation der Lymphome hat in den letzten Jahren einen großen Wandel erfahren. Heute unterscheidet die Weltgesundheitsorganisation (WHO) zwischen reifzelligen B-, T- und NK-Zell-Lymphomen, dem HL, post-Transplantations-lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD) sowie den histiozytären und dendritischen Neoplasien (Swerdlow et al., 2016).

Innerhalb der Gruppe der reifzelligen B-Zell-Lymphome lässt das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von somatischen Hypermutationen in den variablen Bereichen der *IG*-Gene auf den Differenzierungszustand der Ursprungszelle rückschließen. Das Nichtvorhandensein somatischer Hypermutationen weist auf einen Zustand vor einer Keimzentrumsreaktion hin. Hingegen weisen Keimzentrums-B-Zellen und Post-Keimzentrums-B-Zellen wie Plasma- und Gedächtniszellen somatische Hypermutationen in ihren V-Gensegmenten auf. Der Unterschied zwischen diesen Zellgruppen besteht darin, dass der somatische Mutationsvorgang in den Keimzentrumszellen anhält (*ongoing mutations*), während er in den Post-Keimzentrums-B-Zellen weitgehend beendet ist (Coupland et al., 2000b).

### **1.3.1 Entstehung rekurrenter genetischer Veränderungen in B-Zell-Lymphomen**

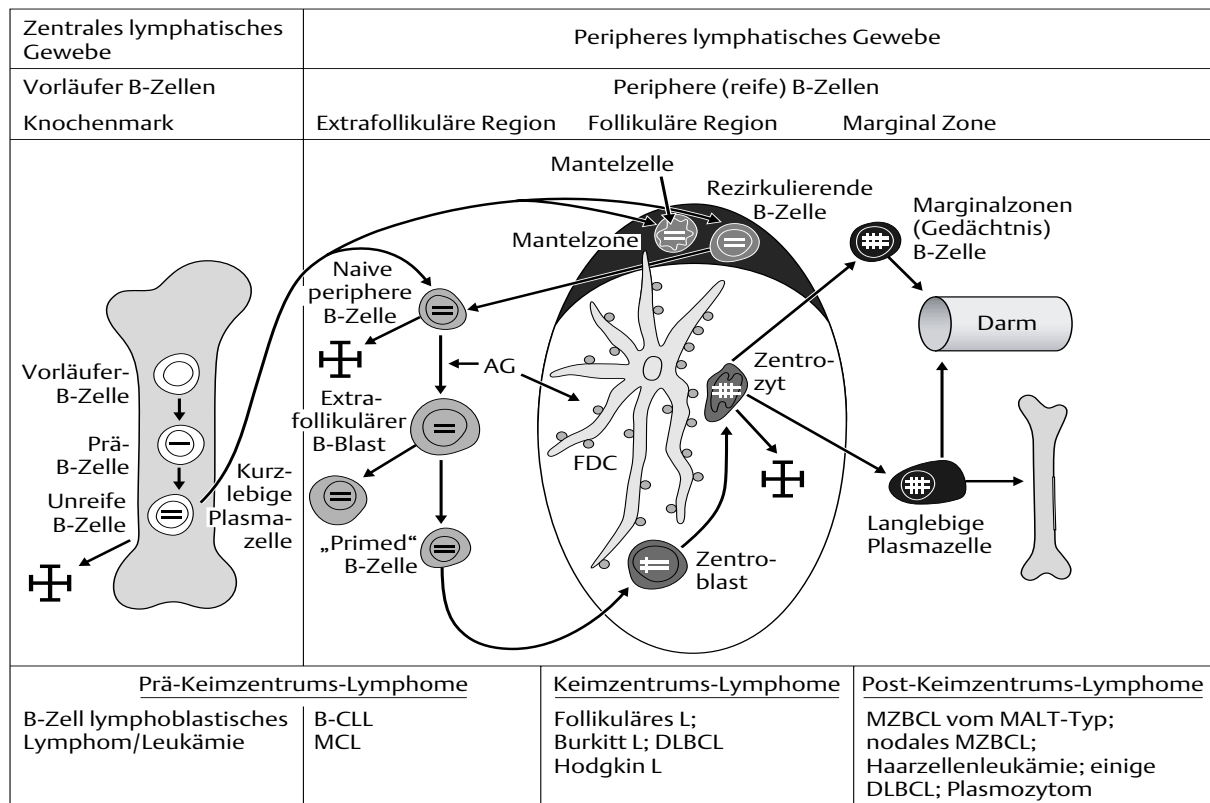
Aberrante *IG*-Genumlagerungen aufgrund chromosomaler Translokationen bestimmen wesentlich die Pathophysiologie reifzelliger B-Zell-Lymphome. Diese strukturellen Veränderungen umfassen Translokationen, die von Doppelstrangbrüchen als Folge von V(D)J-Rekombination, Klassenwechsel oder somatischer Hypermutation ausgehen (Küppers and Dalla-Favera, 2001). Unter normalen Bedingungen vermitteln RAG-Nukleasen bei der V(D)J-Rekombination einen DNA-Doppelstrangbruch an präformierten DNA-Signalsequenzen (siehe Kapitel 1.2.4), die Deletion nicht benötigter Gensequenzen und die Ligation des DNA-Doppelstrangs (Bassing et al., 2002; Hiom et al., 1998; Oettinger

et al., 1990). Eine Translokation kann dabei entstehen, wenn ein durch die RAG-Nukleasen aufgebrochenes DNA-Ende anstelle des *IG*-Gens ein nicht homologes Chromosom unspezifisch angreift und mit diesem ligiert (Hiom et al., 1998). Entsprechend wird das Enzym AID (*activation induced cytidine deaminase*) für die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen während des Klassenwechsels und somatischer Hypermutation diskutiert (Muramatsu et al., 2000).

Ebenfalls scheint AID in der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen bei den Translokationspartnern des *IG*-Gens beteiligt zu sein (Robiannu et al., 2008).

Eine Reihe von Translokationspartnern ist mit bestimmten Subtypen reifzelliger B-Zell-Lymphome assoziiert. So ist die Translokation t(14;18)(q32;q21)/*IGH-BCL2*-Fusion mit dem Follikulären Lymphom (FL), die Translokation t(11;14)(q13;q32)/*CCND1-IGH* mit dem Mantelzelllymphom und die Translokation t(8;14)(q24;q32)/*MYC-IGH*-Fusion mit dem BL assoziiert. Sie alle haben gemein, dass durch die Translokation die kodierende Sequenz eines Protoonkogens (*BCL2*, *CCND1* oder *MYC*) in die Promotor-beziehungsweise Enhancerregion, regulatorischen Komponenten, des in B-Zellen konstitutiv aktiven *IG*-Gens verlagert wird. In der Folge kommt es zu einer dysregulierten Expression des betroffenen Protoonkogens (Küppers and Dalla-Favera, 2001).





**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der physiologischen B-Zellreifung und stadiengerechte Zuordnung von B-Zellneoplasien.** Die somatischen Rekombinationsvorgänge inform von V(D)J-Rekombination und Klassenwechsel werden durch Querbalken, somatische Hypermutationen durch senkrechte Balken repräsentiert. Das Follikuläre Lymphom und das Burkitt Lymphom sind als reifzellige Keimzentrums-B-Zell-Neoplasien erkennbar.

AG=Fremdantigen, FDC=Follikuläre dendritische Zelle, MALT=Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe, L = Lymphom, DLBCL= Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom. (nach Stein et al., 2007)

### 1.3.1.1 Vorkommen rekurrenter genetischer Veränderungen beim Gesunden

Für einige chromosomale Aberrationen bei Lymphomen wie die  $t(14;18)/IGH-BCL2$  ist bekannt, dass mehr als in der Hälfte von Gesunden diese Veränderung nachweisbar ist. Limpens und Kollaboratoren konnten in 13 von 24 (54%) Probanden diese Translokation in Lymphknoten und Tonsillen mit follikulärer Hyperplasie nachweisen (Limpens et al., 1991). Seit dieser Entdeckung wurden die Ergebnisse von Limpens et al. in zahlreichen Studien reproduziert und mit Risikofaktoren korreliert. So konnten in einigen Studien eine Korrelation mit dem Alter des Patienten festgestellt werden (Hirt et al., 2013; Schüler et al., 2009).

Ausgehend von einer Translokation  $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL$  entsteht wiederum bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) oder der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) das Philadelphia Chromosom. (Nowell and Hungerford, 1962). Die zugehörigen Fusionsproteine BCR-ABL p190 bei der CML respektive BCR-ABL p210 bei der ALL,

welche als Tyrosinkinase fungieren, führen nach einer klinisch inapparenten chronischen Phase zur Blastenkrise (Kurzrock et al., 2003). Die komplexen Mechanismen beeinflussen unter anderem Zellsignalwege, Zellwachstum sowie DNA-Reparatur. Eine Reihe von Untersuchungen konnte außerdem das Vorkommen des *BCR-ABL*-Fusionstranskripts in gesunden Individuen zeigen. Diese Erkenntnis war zunächst zufällig in Erscheinung getreten. Biernaux et al. wollten in einer *follow up*-Untersuchung an CML-Patienten mittels molekulargenetischer Verfahren die residuelle Expression von *BCR-ABL*-mRNA im Blut von Knochenmark-transplantierten Patienten, die sich in Remission befanden, untersuchen. Im Blut eines als Kontrolle verwendeten Probanden konnte das Fusionsprodukt in einer bedeutenden Höhe nachgewiesen werden und in Folgearbeiten bestätigt werden (Biernaux et al., 1995).

Aus medizinischer Sicht sind Leukämie- und Lymphomassoziierte chromosomale Aberrationen wichtige Marker in der Diagnose, der Prognose und Therapie der jeweiligen Entitäten. Gleichzeitig sind ihr Vorkommen wichtige Bestandteile der Kontrolle des Therapieansprechens und ihr Auftreten in den Folgeuntersuchungen ist mit einem erhöhten Risiko für das Wiederauftreten der Erkrankung vergesellschaftet. Die biologische Bedeutung des sporadischen Vorkommens chromosomaler Aberrationen ist bislang nicht geklärt. Das Vorkommen translokationspositiver Zellen in einer beträchtlichen Anzahl gesunder Probanden sollte allerdings weiterhin untersucht werden, da immer sensitivere Verfahren im Rahmen der *minimal residual disease*-Diagnostik (MRD) bei gleichzeitig vorkommenden sporadischen chromosomalen Aberrationen zu einer diagnostischen Unsicherheit führen können.

### **1.3.2 Das Burkitt-Lymphom (BL) und klinische Varianten**

Da der Schwerpunkt der folgenden Arbeit auf dem Burkitt-Lymphom (BL) liegt, soll diese im Folgenden näher charakterisiert werden. Die Klinik des BL kann sich mit einem schnellen Wachstum und dem Auftreten ernsthafter onkologischer Notfälle präsentieren (Gascoyne et al., 2011). Das BL zählt zu den aggressiven reifzelligen B-Zell-Lymphomen, die von Keimzentrums-B-Zellen abstammt.

Die WHO differenziert drei distinkte Varianten des BL, die sich in ihrer klinischen Präsentation und der anatomischen Manifestation des Primärtumors, aber auch in ihrer Morphologie, sowie ihrer Genetik und Biologie unterscheiden. Diese sind das endemische,

das sporadische und das Immundefizienz-assoziierte BL (Swerdlow et al., 2008; Gascoyne et al., 2011).

Das in Äquatorialafrika, Papua-Neuguinea sowie Teilen Südamerikas endemisch vorkommende BL (eBL) korreliert mit der geographischen Ausbreitung von Malaria (Malaria-Gürtel). Die Erkrankung betrifft fast ausschließlich Kinder im Alter zwischen 2 und 14 Jahren mit der höchsten Inzidenz im Alter von 5 Jahren. Jungen sind doppelt so häufig betroffen wie Mädchen. Klinisch imponiert der Befall des Kiefers und geht meist angeführt von den Nieren mit einem abdominellen Tumorbefall einher. Es können aber auch weitere extranodale Herde wie die Orbita, das zentrale Nervensystem, die Schilddrüse und Speicheldrüsen, die Geschlechtsorgane sowie die langen Röhrenknochen betroffen sein (Burkitt, 1962; Swerdlow et al., 2008). Die Lymphomzellen weisen in nahezu 100% der Fälle eine Infektion durch das Epstein-Barr-Virus (EBV), einem Herpesvirus, auf. Diese Tatsache unterstützt die Theorie, dass das Virus einen Kofaktor in der Tumorgenese des eBL darstellen könnte (Magrath, 1990; Rowe et al., 2009).

Das sporadische BL (sBL) macht 25% der kindlichen Lymphome aus und ist im Erwachsenenalter eher ungewöhnlich, wo sein Anteil nur noch 0,4% beträgt (Oschlies and Klapper, 2014). Das Medianalter beträgt für das kindliche sBL 8 Jahre. Jungen erkranken bis zu fünf Mal häufiger als Mädchen. Bei den jungen Patienten gilt die Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 92% insgesamt als gut (Deutsches Kinderkrebsregister Jahresbericht 2013/14, [www.kinderkrebsregister.de/](http://www.kinderkrebsregister.de/). Zugegriffen am 13. Juli 2015). Am häufigsten manifestiert sich das sBL im Bauchraum, wo es bevorzugt das terminale Ileum oder die Ileozökalregion befällt. Andere Lokalisationen betreffen die Ovarien, die Nieren, die Brust sowie die Lymphknoten. Das Knochenmark kann häufiger als beim eBL von einem ausgeprägten Befall durch die Tumorzellen begleitet sein (Magrath and Sariban, 1985; Wright et al., 1997). In diesem Fall spricht man von einem leukämischen Verlauf oder von einer Burkitt-Leukämie. Ein Befall von Knochenmark und zentralem Nervensystem sind auffallend häufig miteinander vergesellschaftet. (Sariban et al., 1983). Das EBV ist in nur 15-20% der aus dem europäischen und nordamerikanischen Raum berichteten sBL-Fälle nachweisbar (Jaffe and Pittaluga, 2011). Eine weitere Variante des BL, das Immundefizienz-assoziierte BL, steht im Zusammenhang mit einer HIV-Erkrankung im AIDS-Stadium, wird aber auch bei Immunkompromittierung als Folge eines hereditären Immundefekts oder im Zuge einer immunsuppressiven Therapie als Zustand nach Organtransplantation beobachtet

(Frizzera et al., 1980; Raphael et al., 1991; Levine, 1992; Kaplan et al., 1994).

Alle drei Lymphomvarianten können gleiche histomorphologische Merkmale innehaben. Der klassische Typ präsentiert sich als ein diffuses, monomorphes Infiltrat kleiner Zentroblasten, die ein kohäsives Wachstumsmuster aufweisen. Die Zentroblasten weisen ein schmales Zytoplasma auf und enthalten 2-5 Nucleoli. Die Größe eines Zentroblasten entspricht in etwa der Zellkerngröße umliegender Makrophagen. Diese sogenannten Kerntrümmermakrophagen liegen eingestreut in dem engen Blastenrasen vor und bilden dadurch das typische Sternenhimmelbild (*starry sky*). Sie phagozytieren die Zelltrümmer apoptotischer Tumorzellen (Berard, 1969; Oschlies and Klapper, 2014).

### 1.3.3 Genetische Veränderungen beim BL

Definitionsgemäß umfasst das BL solche reziproken Translokationen, welche das *MYC*-Onkogen auf dem Chromosom 8q24 und einen der *IG*-Loci auf den Chromosomen 2, 14 oder 22 einbeziehen. In 75% der Fälle wird die kodierende Einheit des *MYC*-Gens in die Nähe der *IG*-Enhancer des *IGH*-Locus auf dem Chromosom 14q32 verlagert. Entsprechend wird sie bei den Variant-Translokationen in die Nähe des *IGK*-Locus auf dem Chromosom 2p12 respektive des *IGL*-Locus auf dem Chromosom 22q11 transloziert (Willis and Dyer, 2000).

Nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen weisen 70% der sBL eine konstitutive Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalwegs auf. Dieser ist an einer Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen wie Zellwachstum und Zellproliferation beteiligt. Eine übermäßige Aktivierung des *PI3K*-Signalwegs tritt auf, wenn es zu Mutationen kommt, die z.B. die Aktivität des Transkriptionsfaktors *TCF3* deregulieren oder aber dessen negativen Regulator *ID3* inaktivieren (Love et al., 2012; Schmitz et al., 2012). In Arbeiten von Richter et al. konnten in 68% molekulargenetisch gesicherter BL Mutationen des *ID3*-Gens nachgewiesen werden. Möglicherweise spielen *ID3*-Mutationen eine Schlüsselrolle bei der Lymphomgenese des BL (Richter et al., 2012).

## 1.4 Ziele und Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war, zu analysieren, ob die Translokation *t(8;14)/MYC-IGH* in Peyer Plaques ähnlich wie die *t(14;18)/IGH-BCL2* beim FL oder die *t(9;22)/BCR-ABL* bei der CML in gesunden Probanden im Zuge der physiologischen B-Zell-Reifung entsteht. In der Literatur findet sich bisher keine weitere Untersuchung, die

mit der in dieser Arbeit gewählten Methode gesunde Probanden auf prä-maligne t(8;14)/*MYC-IGH*-positive Zellen untersuchte. Im Einzelnen sollten folgende Punkte verfolgt werden:

1. Zunächst sollte ein hochsensitives diagnostisches Vier-Farb-FISH-Assay zur Untersuchung auf die t(8;14)/*MYC-IGH* entwickelt und an Kontrollen etabliert werden.
2. Gewebeproben aus der Ileozökalregion von Probanden ohne Lymphom sollten mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf das Vorhandensein prä-maligner B-Zellen mit der t(8;14)/*MYC-IGH* untersucht werden.
3. Bei Nachweis der Translokation in den nicht-neoplastischen Gewebeproben sollte durch die Kombination von FISH und Immunfluoreszenz der Reifungsgrad der prä-malignen B-Zellen sowie ihre funktionelle Lokalisation bestimmt werden.
4. Basierend auf den erhobenen Ergebnissen sollten Rückschlüsse auf die Entstehung des BL gezogen werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Probenmaterial

Dem Screening zur Untersuchung der  $t(8;14)/MYC-IGH$  an 25 gesunden Kindern ohne Lymphommanifestation wurde die Validierung und Bestimmung von Nachweisgrenzen des neu entwickelten hochsensitiven Vier-Farb-FISH-Assays vorangestellt. Diese erfolgte an Positiv- sowie Negativkontrollen.

In den folgenden Unterkapiteln werden die verwendeten Kontrollen sowie die Herkunft der Patientenproben näher charakterisiert. Die Arbeit wurde im Rahmen und nach den Richtlinien des Netzwerkprojektes „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ der deutschen Krebshilfe durchgeführt. Für dieses Projekt liegen positive Voten, u.a. der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vor (Ethik-Votum D447/10).

#### 2.1.1 Material für Kontrolluntersuchungen

##### 2.1.1.1 Zytogenetische Zellkernsuspensionen

Als Negativkontrollen für das Vier-Farb-FISH-Assay dienten in Carnoy's Fixativ (Methanol: Eisessig 3:1) asservierte Zellkerne von fünf freiwilligen gesunden männlichen Probanden mit normalem Karyotyp (46,XY), die aus peripherem Blut (pB) gewonnen wurden. Sie entstammten der Routinediagnostik des Zytogenetischen Labors des Instituts für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Ihnen werden im Folgenden die Kontrollnummern 1 bis 5 zugeordnet.

**Tabelle 2.1:** Charakterisierung der verwendeten zytogenetischen Zellkernsuspensionen.

Kontroll-nummer	Material	Geschlecht	Karyotyp
1	pB	m	46,XY
2	pB	m	46,XY
3	pB	m	46,XY
4	pB	m	46,XY
5	pB	m	46,XY

pB: peripheres Blut

### 2.1.1.2 BL-Zelllinien

Als Positivkontrollen für das Vier-Farb-FISH-Assay dienten asservierte fixierte Zellkerne, gewonnen aus der Kultivierung von fünf EBV-negativen BL-Zelllinien. Die angewandten BL-Zelllinien und ihre zytogenetischen Charakteristika sind in der folgenden Tabelle 2.1 zusammengefasst.

**Tabelle 2.2:** Charakterisierung der verwendeten BL-Zelllinien (nach Murga Penas et al., 2014).

Kontroll-nummer	BL-Zelllinie	Karyotyp
6	Daudi	46,XY,t(8;14)(q24;q32)
7	DG75	46,XY,der(4)t(4;18)(q32-34;q2?2),t(8;14)(q24;q32)
8	BL41	46~47,XY,der(1)t(1;1)(p22;?)t(1;5)(q12;q11),del(4)(q12),der(5)t(5;7)(q11;q11),der(8)t(4;8)(q12;q24),t(8;14)(q24;q32),der(15)t(3;15)(?;p11),+16,der(16)t(7;16)(?p12;q11),der(17)t(1;17)(q11-q12;p11),der(20)t(12;20)(?;q13)t(1;12)(?q31;?),der(21)t(15;21)(q?11;p11)/47-48,sl,+i(7)(q10)
9	BL70	47,XY,dup(1)(q21q25),del(2)(q33),+7,t(8;14)(q24;q32),t(12;22)(q15;q13)
10	CA46	46,X,-Y,dup(1)(q21q32),dup(7)(q?21q?22),t(8;14)(q24;q32),i(13)(q10),+16/47,sl,+der(7;13)(q10;q10)

### 2.1.1.3 Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete-Gewebeschnitte

Ebenso wurde das Vier-Farb-FISH-Assay an fünf Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE)-Gewebeschnitten lymphatischer Gewebe getestet, die freundlicherweise von Professor W. Klapper, Direktor des Instituts für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel, zur Verfügung gestellt wurden.

Zusätzlich wurde das Vier-Farb-FISH-Assay an fünf FFPE-Gewebeschnitten mit molekularzytogenetisch nachgewiesener t(8;14)/*MYC-IGH*-Fusion erprobt. Diese Gewebe wurden von Professor W. Klapper, Professor H.-H. Wacker und dem Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Erlangen bereitgestellt.

Die patientenbezogenen pathohistologischen Charakteristika, Alter und Geschlecht sind im Tabelle 2.2 gelistet.

**Tabelle 2.3:** Charakterisierung der verwendeten t(8;14)/*MYC-IGH*-negativen und t(8;14)/*MYC-IGH*-positiven FFPE-Gewebe.

Kontroll-nummer	Alter	Geschlecht	Diagnose	Lokalisation (falls angegeben)
11	26	m	Lymphadenitis	zervikaler Lymphknoten
12	5	w	Lymphadenitis	axillärer Lymphknoten
13	33	m	Lymphadenitis	zervikaler Lymphknoten

## Material

<b>14</b>	37	w	hyperzelluläres Knochenmark bei Anämie	Beckenkamm
<b>15</b>	13	m	Lymphadenitis	Lymphknoten
<b>16</b>	80	n.b.	BL	n.b.
<b>17</b>	8	m	BL	Ileozökalregion
<b>18</b>	8	m	BL	zervikaler Lymphknoten
<b>19</b>	39	m	BL	Magenschleimhaut
<b>20</b>	45	n. b.	BL	n. b.

Altersangaben in Jahren. m: männlich; w: weiblich. N.b: nicht bekannt

### **2.1.2 Patientenkollektiv für das Screening zur Untersuchung der t(8;14)/MYC-IGH**

Für das Screening zur Untersuchung von t(8;14)/MYC-IGH-positiven Vorläuferpopulationen in den Peyerschen Plaques nicht-neoplastischen Ileozökalgewebes wurden zusammen mit Professor Dr. W. Klapper Ileozökalbiopsate von Kindern und Jugendlichen aus dem Jahr 2011 ausgewertet. In die Durchsicht wurden Kinder und Jugendliche bis 20 Jahre aufgenommen.

Indikationen für Schleimhautbiopsien des terminalen Ileums kommen selten bei Kindern vor. Das Material stammte zumeist aus Darmresektaten bei Zustand nach Volvulus, nach nekrotisierender Enterokolitis, bei Zökumperforation, bei chronischer Diarrhoe oder anderen klinischen Symptomen mit Verdacht auf eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung. Weiterhin entstanden einzelne Biopsien im Rahmen von diagnostischen Stufenbiopsien bei Vorhandensein von Darmpolypen an anderer Lokalisation.

In die Untersuchung wurden Dünndarm-Schleimhautbiopsate mit zumeist regulärem Zottenrelief und ohne Anhalt für eine maligne Neoplasie aufgenommen, wenn sie gleichzeitig Anschnitte von Peyerschen Plaques enthielten. Ausgeschlossen wurden solche Biopsate, wenn sie ausgedehnte floride Entzündungen oder Neoplasien in Form von hyperplastischen Polypen vorwiesen oder aber keine Lymphfollikel enthielten.

Die pathohistologischen Charakteristika, Alter und Geschlecht sowie die klinischen Angaben zum Patientenprofil sind in Tabelle 2.3 gelistet.



**Tabelle 2.4:** Patientenbezogene Charakterisierung des pathohistologischen Befundes, Alters und Geschlechts sowie klinische Angaben.

Fall-nummer	Alter	Geschlecht	Diagnose	Lokalisation	Klinische Symptomatik (falls angegeben)
1	19	m	mittelgradig chronische und fokal gering floride diskontinuierliche und gering disproportionierte Kolitis	Ileum	
2	18	w	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat mit regulärem Zottenrelief und lymphofollikulärer Hyperplasie	Ileum	
3	16	m	regelhafte Dünndarmschleimhaut	Ileum	chronische Diarrhoe
4	17	w	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat mit regulärem Zottenrelief	term. Ileum	
5	19	w	Schleimhautbiopsat mit etwas verplumpten Zotten und einer mittelgradig chronischen und floriden Ileitis	term. Ileum	
6	48h	m	Schleimhautresektat mit fokaler ausgeprägter Dilatation und hochgradiger Ausdünnung der Wandung und flacher Schleimhautregeneration	prä-term. Ileum	unklare intrauterine Darmischämie, männlicher Zwilling, 20SSW mit fetofetalem Transfusionssyndrom
7	18	w	tumorfrees Schleimhautbiopsat mit lymphofollikulärer Hyperplasie	term. Ileum	
8	17	m	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat mit lymphofollikulärer Hyperplasie	Ileum	
9	18	w	tumorfrees Schleimhautbiopsat mit lymphofollikulärer Hyperplasie	term. Ileum	
10	15	m	tumorfrees Schleimhautbiopsat mit lymphatischer Hyperplasie	Ileum	
11	20	w	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat mit regulärem Zottenrelief und lymphofollikulärer Hyperplasie	term. Ileum	
12	19	m	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat mit regulärem Zottenrelief und geringer lymphofollikulärer Hyperplasie	Ileum	
13	15d	m	ausgedehnter Wanddefekt im Bereich des Zökals	term. Ileum	gedeckte Zökumperforation, Perfusionsstörung
14	17	w	tumor- und entzündungsfreies Dünndarmschleimhautbiopsat	term. Ileum	
15	19	m	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat mit schlankem Zottenrelief und ausgeprägter lymphofollikulärer Hyperplasie	term. Ileum	

## Material

<b>16</b>	18	w	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat mit regulärem Zottenrelief und lymphofollikulärer Hyperplasie	term. Ileum	
<b>17</b>	17	w	Dünndarmschleimhaut mit lymphofollikulärer Hyperplasie	term. Ileum	polypöse Schleimhautvorwölbungen, Ausschluss CED
<b>18</b>	17	w	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat	term. Ileum	
<b>19</b>	19	w	Schleimhautbiopsat mit lymphofollikulärer Hyperplasie und einer diskreten Entzündung	term. Ileum	
<b>20</b>	19	w	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat	term. Ileum	
<b>21</b>	12	m	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat mit geringer lymphofollikulärer Hyperplasie	term. Ileum	
<b>22</b>	11W	m	Schleimhautbiopsat mit geringer chronischer, fokal erosiver Entzündung	term. Ileum	Zustand nach NEC mit Anlage eines 3er-AP
<b>23</b>	3W	w	herdförmige Fibrosierung	term. Ileum	Zustand nach Darmresektion bei Volvulus und Duplikatur
<b>24</b>	15W	w	Schleimhautbiopsat mit fokal geringer chronischer Entzündung und Fibrosierung	term. Ileum	Zustand nach NEC
<b>25</b>	19	w	tumor- und entzündungsfreies Schleimhautbiopsat mit lymphofollikulärer Hyperplasie	Ileum	

Altersangaben in Jahren, Ausnahme: h für Stunden, d für Tage, W für Wochen; m: männlich; w: weiblich; term. Ileum: terminales Ileum; CED: chronisch entzündliche Darmerkrankung; NEC: nekrotisierende Enterokolitis; AP: Anus praeter

## 2.2 Geräte und Software

Der folgende Abschnitt enthält die bei den Versuchen verwendeten Materialien mit Ausnahme von gebräuchlichen Laborgerätschaften wie Glaswaren und Pipetten, die nicht gesondert aufgeführt werden.

**Tabelle 2.5:** Verwendete Geräte und Software.

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Function, Line	Heraeus Instruments
Deckglas Ø 10 mm		Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Deckglas 18x18 mm		Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Deckglas 24x60 mm		Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Diamantschreibstift		
Filtersätze	Multiband-Filtersysteme	AHF, Tübingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Gummibälle		Omnilab, Bremen, Deutschland
Isis-Workstation Metasystems	Version 5.2.11	Metasystems, Altlußheim, Deutschland
Laborschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laborzentrifuge	Mikro 200	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Laborzentrifuge	Heraeus Multifuge X1R	Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA
Metallbox		Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Metallständer		Assistent, Karl Hecht, Sondheim v.d. Rhön, Deutschland
Objektträger		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipette 150mm		Assistent, Karl Hecht, Sondheim v.d. Rhön, Deutschland
Pipettierhelfer	Accupette	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pinzette	Material Inox	
Schnellkochtopf	Clipso	Tefal, Rumilly, Frankreich
Vacuumzentrifuge	Speedvac RC 1010	Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA
VP 2000	VP 2000 Processor	Abbott, Chicago, Il, USA
Wasserbad		ROWA, Heimsheim, Deutschland

## 2.3 Reagenzien und Lösungen

Citronensäure, 99,5%, wasserfrei (Th. Geyer, Renningen, Deutschland)

DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octane) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)

DAPI (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA)

Dextransulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)  
Ethanol, absolut (Th. Geyer, Renningen, Deutschland)  
Fixogum (Marabu, Tamm, Deutschland)  
Formamid, deionisiert (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)  
Glycerol (Th. Geyer, Renningen, Deutschland)  
Human-Cot-1 DNA (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)  
Igepal® CA-630 (Th. Geyer, Renningen, Deutschland)  
Methanol (J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, Pa, USA)  
Natriumacetat-Trihydrat, 99,5% (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
Natronlauge, 5mol/l (Th. Geyer, Renningen, Deutschland)  
Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)  
Protease (Abbott, Chicago, Il, USA)  
Protease Puffer (Abbott, Chicago, Il, USA)  
Roti®-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
SSC (Saline Sodium Citrate), 20fach konzentriert (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA)  
Tris-Hcl Puffer, 1M, pH 8,0 (Tris(hydroxymethyl)aminomethane Hcl) (Biomol, Hamburg, Deutschland)  
Vectashield® Mounting Media (Axxora, Lörrach, Deutschland)

## 2.4 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden freundlicherweise durch die Medizinisch-Technischen Angestellten des FISH-Labors der Humangenetik zur Verfügung gestellt.

Antifade:

1,15g DABCO, 4 ml Aqua dest. und 1 ml Tris-HCL wurden in 45 ml Glycerol gelöst.

Citratpuffer, 0,01M, pH 6,0:

2,3g Citronensäure in circa 800 ml Aqua dest. lösen. 5,4 ml 5M NaOH hinzu pipettieren und bis 1000ml mit Aqua dest. auffüllen.

Dextransulfat, 40%:

8g Dextransulfat wurde unter Erwärmung in 20 ml Aqua dest. gelöst.

### Mastermix:

2,5 ml deionisiertes Formamid, 1,25 ml 40%iges Dextransulfat und 0,5 ml 20fach konzentriertes SSC werden in 0,25 ml Aqua dest. gelöst.

### NaAc, 3M, pH 5,0:

40,82g Natriumacetat-Trihydrat in circa 80 ml Aqua dest. lösen. Den pH mit Natronlauge auf 5,3 einstellen. Anschließend bis 100 ml mit Aqua dest. auffüllen.

### Protease Lösung:

In 500 ml Proteasepuffer wurden 250mg Protease gelöst.

### Paraformaldehyd, 1%:

10g Paraformaldehyd wurden unter Erwärmung in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

### SSC, 2fach konzentriert:

20fach konzentriertes SSC wurde im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

### Waschpuffer 1:

20 ml 20fach konzentriertes SSC und 3 ml Igepal wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

### Waschpuffer 2:

100 ml 20fach konzentriertes SSC und 1000 µl Igepal wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

### 3 METHODEN

Bei den methodischen Verfahren wurden die im zytogenetischen Labor am Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel geltenden Standardarbeitsanweisungen angewandt.

#### 3.1 Etablierung eines Vier-Farb-FISH-Assays

Zum Screening hinsichtlich der ausgewählten Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  ist die Interphase-FISH mit einem Vier-Farb-FISH-Assay aus Bruchpunkt-flankierenden Sonden gewählt worden.

Die FISH-Hybridisierung stellt ein molekularzytogenetisches Verfahren dar. Anhand dieses Verfahrens lassen sich numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen nachweisen. Bei der typischen BL definierenden Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  handelt es sich um eine strukturelle Chromosomenaberration, die es anhand des hergestellten Sonden-Assays in BL-Zelllinien aufzuzeigen sowie in Zellen mit normalem Karyotyp auszuschließen galt. Die fluoreszenzmarkierten Sonden binden spezifische Chromosomenbereiche und werden unter dem Fluoreszenzmikroskop farbig zur Darstellung gebracht, indem die Sonden durch den Einsatz entsprechender Filtervorsätze in einem bestimmten Farbspektrum angeregt werden. In der vorliegenden Arbeit sind vier verschiedene Fluorophore für die jeweils Bruchpunkt-flankierenden Bereiche gewählt worden. Ein positives Ergebnis definierte sich durch das gemeinsame Auftreten von zwei Bruch- und Fusionsereignissen. Der Vorteil dieser zwei Kriterien lag darin, dass die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse verringert werden konnte. Damit soll die Anzahl der durch das Schnittverfahren erzeugten falsch-positiven Ergebnisse reduziert werden.

Im Gegensatz zu der bereits etablierten Anwendung der kommerziell erhältlichen LSI MYC Dual Color Break Apart Probe (BAP, *MYC-BAP*) des Herstellers Abbott-Vysis zur Detektion der  $t(8;14)/MYC-IGH$  können mit der gewählten Vier-Farb-FISH in nur einem Hybridisierungsverfahren sowohl die Fusion *MYC-IGH* aber auch die Fusion der derivativen Chromosomen dargestellt werden. Hierdurch sollen ebenfalls falsch-positive Ergebnisse minimiert werden.

Die Kenntnis über das gesamte menschliche Genom sowie dessen Verfügbarkeit in Form von Bakterienklonen, genannt BACs (aus dem englischen *Bacterial Artificial*

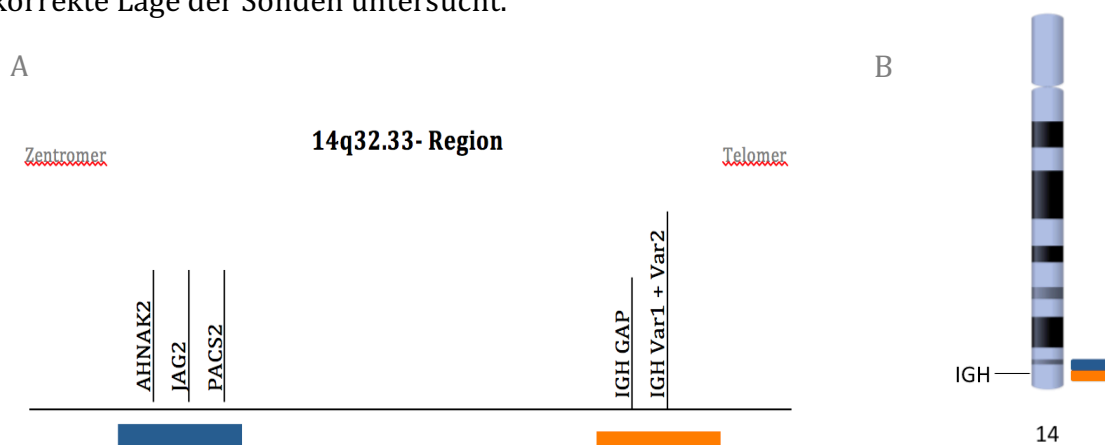
*Chromosomes*), die Fragmente von 50-300 Kilobasenpaare (Kb) Länge des menschlichen Genoms verschlüsseln, ermöglichen die zuverlässige Herstellung von eigenen FISH-Sonden. Die BACs werden in der Datenbank *Human Genome Browser Gateway* gelistet. Sie können anschließend mit Fluorophoren markiert werden. Wir wählten zur Charakterisierung der Bruchpunktregion 14q32 des *IGH*-Locus SpectrumAqua-markierte BAC-Sonden aus, die zentromerisch bzw. proximal des *IGH*-Locus binden.

**Tabelle 2.5:** Eingesetzte BAC-Klone für die SpectrumAqua-markierte *IGH*-Sonden.

Klon-Bezeichnung	Locus	Position	RefSeq
RP11-150i16	14q32.33	104,830,387...104,995,810	<i>CEP170B, PLD4, AHNAK2, c14orf79</i>
RP11-817G24	14q32.33	104,995,813...105,222,361	<i>CDCA4, GPR132, JAG2, MIR6765, NUDT14</i>
RP11-937M13	14q32.33	105,222,364...105,410,611	<i>BTBD6, PACS2</i>

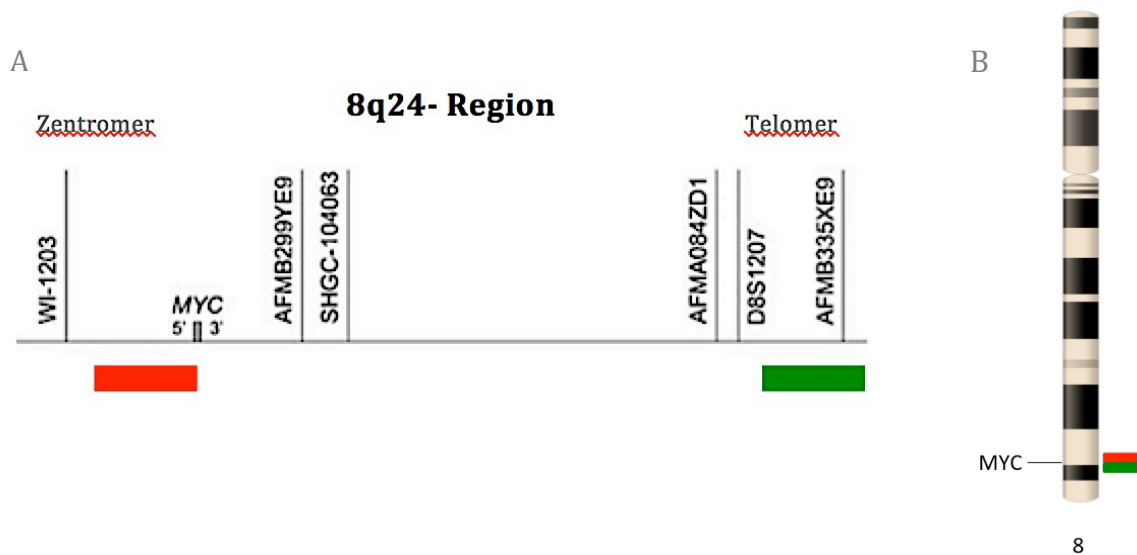
RefSeq: NCBI Reference Sequences Collection

Zur Darstellung des Bereiches telomerisch bzw. distal des *IGH*-Locus verwendeten wir die vom Hersteller Abbott-Vysis entwickelten SpectrumGold-markierten Sonden IGH GAP, IGH Var1 und IGH Var2. Zunächst wurde an Metaphasen von gesunden Spendern die korrekte Lage der Sonden untersucht.



**Abbildung 3.1: A: Schematische Darstellung des FISH-Assays zur Charakterisierung der 14q32.33-Region.** Zur besseren Übersicht sind die durch das Assay gebundenen Gene dargestellt. Zentromerisch des *IGH*-Locus bindet eine SpectrumAqua-markierte Sonde (hier blau), telomerisch des *IGH*-Locus eine SpectrumGold-markierte Sonde (hier orange). **B: Ideogramm des Chromosoms 14** (hier farblich hervorgehoben). Die bruchpunktflankierenden Sonden des *IGH*-Sondenassays sind schematisch dargestellt. (Hier und in den folgenden Abbildungen erstellt mithilfe der ‚Genome Decoration Page‘ [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp))

Für die Bruchpunktregion 8q24 ist eine kommerziell verfügbare *MYC*-BAP des Herstellers Abbott-Vysis gewählt worden. Diese besteht aus einer SpectrumOrange-markierten, zentromerisch bzw. proximal des *MYC*-Gens sowie einer SpectrumGreen-markierten, telomerisch bzw. distal des *MYC*-Gens bindenden Sonde.

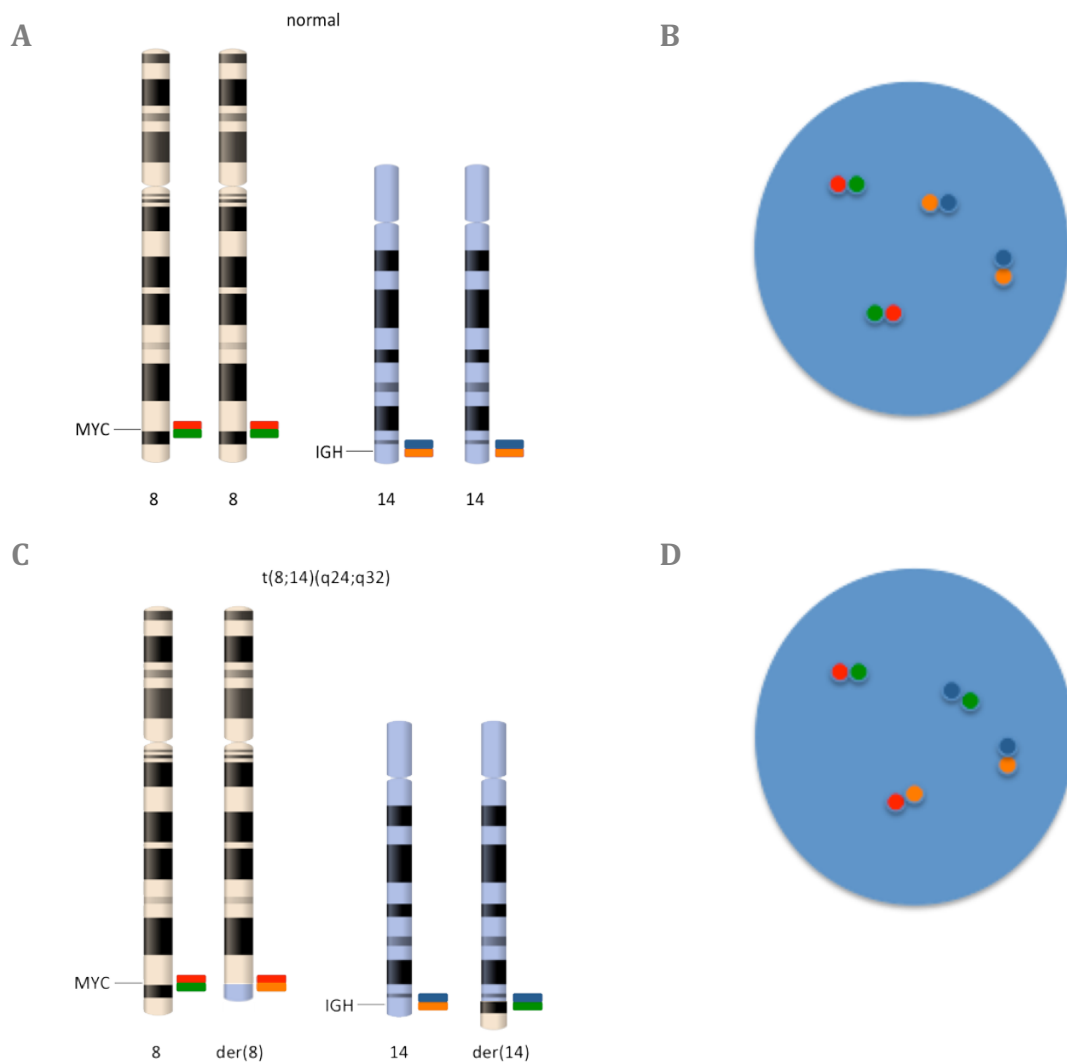


**Abbildung 3.2: A: Schematische Darstellung des FISH-Assays zur Charakterisierung der 8q24-Region.** Zur besseren Übersicht sind die durch das Assay gebundenen Gene dargestellt. Zentromerisch des *MYC*-Gens bindet eine SpectrumOrange-markierte Sonde (hier rot), telomerisch des *MYC*-Gens eine SpectrumGreen-markierte Sonde (hier grün). (modifiziert nach Produktbeschreibung des Herstellers, Abbott-Vysis) **B: Ideogramm des Chromosoms 8** (hier farblich hervorgehoben). Die bruchpunktflankierenden Sonden des *MYC*-Sondenassays sind schematisch dargestellt.

Bei einem Assay dieser Art von Sonden sind für jede der untersuchten Zielgene zwei Paare kolokalisierter Signale zu erwarten, die die beiden Allele eines Gens repräsentieren. Entsprechend treten bei dem zugrunde liegenden Vier-Farb-FISH-Assay in einem intakten normalen, diploiden Interphasezellkern vier kolokalisierte Signale, zwei rot/grün-kolokalisierte Signale für das *MYC*-Gen auf zwei normalen Chromosomen 8 und zwei blau/gold-kolokalisierte Signale für den *IGH*-Locus auf zwei normalen Chromosomen 14 auf (Abbildung 3.3, A und B). Insgesamt werden bei gesunden Zellen vier Kolokalisationen erwartet (2Ko-MYC+2Ko-IGH).

Bei Zellen mit einer t(8;14)/*MYC*-*IGH*, in denen ein Allel des *MYC*-Gens und des *IGH*-Gens reziprok tranloziert sind, ergibt sich auf die derivativen Chromosomen 8 und 14 je zwei Fusionssignale. Auf dem derivativen Chromosom 14 kommt es zu einem blau/grün-Fusionssignal aufgrund der Translokation des distalen Anteils des *MYC*-Gens (grün markiert). Auf dem derivativen Chromosom 8 wird ein ein rot/gold Fusionssignal aufgrund der Translokation des distalen Anteils des *IGH*-Locus (gold markiert) sichtbar. Zusätzlich zeigen sich zwei rot/grün- und blau/gold-kolokalisierte Signalkpaare auf den Chromosomen 8 und 14 jeweils, die nicht an der t(8;14)/*MYC*-*IGH* beteiligt sind (Abbildung 3.3, C und D). Insgesamt werden bei Zellen mit einer t(8;14)/*MYC*-*IGH*-Fusion zwei Kolokalisationen und zwei Fusionsignale erwartet (2Fus+1Ko-MYC+1Ko-IGH).





**Abbildung 3.3: A: Ideogramm der Chromosomen 8 und 14 im diploiden Chromosomensatz. B: schematische Darstellung des Vier-Farb-FISH-Assays der Konstellation aus A.** Gesunde Zellen zeigen 2Ko-MYC+2Ko-IGH: jeweils zwei kolokalisierte Signale für das MYC-Gen (rot und grün zusammen) und den IGH-Genlocus (blau und gold zusammen). **C: Ideogramm der t(8;14)/MYC-IGH im diploiden Chromosomensatz. D: schematische Darstellung einer Interphase-FISH der Konstellation aus C.** Bei der reziproken Translokation entstehen 2Fus+1Ko-MYC+1Ko-IGH: ein rot/gold Fusionssignal und ein grün/blau Fusionssignal auf den je derivativen Chromosomen 8 und 14 sowie ein rot/grün und ein blau/gold kolokalisiertes Signalpaar auf je ein unauffälliges Chromosom 8 und Chromosom 14.

### 3.2 Sondenfällung für FISH

Für die Herstellung der Hybridisierungslösung wurden die Sonden in einem 50-prozentigen Mastermix aufgelöst. Die für den proximalen Anteil des langen Arms von Chromosom 14 eingesetzte Sonde aus den BAC-Klonen RP11-150i16, RP11-817G24 und RP11-937M13 lag bereits isoliert, fluoreszenzmarkiert und aufgereinigt vor. Für ihre Aufnahme in der Hybridisierungslösung musste die Sonde durch humane Cot-1-DNA gefällt werden. Humane Cot-1-DNA enthält hochrepetitive unmarkierte Sequenzen und

bindet bei dem als Preannealing bezeichneten Prozess an repetitive Sequenzen innerhalb der Sonden. Bei der nachfolgenden Hybridisierung wird so verhindert, dass sich die repetitiven Sequenzen der Sonde mit den repetitiven Sequenzen innerhalb des Genoms der Probanden zusammenlagern. Ohne dieses Procedere würden außerhalb des spezifischen Locus der eingesetzten Sonde unspezifische Hybridisierungen und somit unspezifische FISH-Signale entstehen.

1. Als Erstes wurde ein 1,5 ml Tube mit dem Klonnamen und der entsprechenden Fluoreszenzmarkierung beschriftet.
2. In das Tube wurden 10 µl Cot-1 DNA pipettiert.
3. Dazu wurden je 10 µl der zu fällenden Sonden hinzu pipettiert.
4. Der Ansatz wurde in Höhe von 1/10 des Reagenzvolumens mit NaAc versetzt.
5. Nun wurden 100 prozentiges Ethanol in Höhe des 2,5-fachen Reagenzvolumens hinzugegeben.
6. Das Reagenz wurde bei 15.200 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.
7. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen.
8. Das Tube wurde für 15 Minuten bei 40-50 °C in die Speedvac gestellt und diese abgedunkelt.
9. Als das Pellet getrocknet war, wurden 10 µl 50-prozentiger Mastermix hinzu pipettiert.
10. Das Tube wurde abgedunkelt in den Schüttler gestellt, bis sich das Pellet vollständig auflöste.

Zur Kontrolle der Sonden wurden diese mittels FISH an Zellen von gesunden männlichen Probanden getestet. Dabei wurde die Sondenlokalisation an der zu erwartenden Lokalisation an Metaphasepräparaten bestätigt.

11. In den Ansatz wurden anschließend die übrigen Sonden hinzu pipettiert. Hierzu wurden 1,8µl der kommerziellen Sonden *IGH GAP*-, 2,75µl des *IGH Var1*, 2,5µl des *IGH Var2*- und 5µl der *MYC-BAP* verwendet (Schlegelberger et al., 1999).

### 3.3 FISH Verdau

Für eine FISH-Hybridisierung an Zellkernen müssen die Zellen entsprechend vorbehandelt werden.

Hierfür werden die Zellen auf Objektträger aufgetragen und einem enzymatischen Verdau durch Proteasen zugeführt. Durch diese enzymatische Vorbehandlung werden Bestandteile des Zytoplasmas sowie der Membranen der Zelle und des Zellkerns abgebaut. Die Vorbehandlung dient dazu, den Zugang der Sonden in den Zellkern zu erleichtern sowie einen störenden Fluoreszenzhintergrund für die spätere Auswertung zu verhindern. Der als Verdau bezeichnete Prozess erfolgte am VP2000 Processor des Herstellers Abbott Molecular. Die zugehörige Software enthält vorprogrammierte Protokolle, die den robotergestützten Protease-Verdau steuern.

Für die Etablierung des Vier-Farb-Sondenassays wurde das Sonden-Kit an Zellen mit normalem Karyotyp aus der Routinediagnostik sowie an BL-Zelllinien getestet.

1. Zur Vorbereitung der Objektträger wurden diese entsprechend beschriftet, die Zellsuspensionen zentrifugiert und der Bodensatz mit den darin konzentrierten Zellkernen mithilfe einer Pasteurpipette abgenommen und einige Tropfen auf den Objektträger aufgetropft. Die Objektträger wurden zum Trocknen unter Raumluft belassen.
2. Zum Aufsuchen geeigneter Hybridisierungsfelder wurden die Objektträger unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Ein Hybridisierungsfeld sollte ausreichend Interphasezellkerne sowie möglichst Zellen in der Metaphase enthalten, um an diesen die Lokalisation der Sonden besser nachvollziehen zu können. Mit einem Diamantschreiber wurde das ausgewählte Areal durch einen im Durchmesser circa 1 cm messenden Kreis auf der Rückseite des Objektträgers markiert. Die aufzutragende Sonde wurde ebenfalls auf dem Objektträger beschriftet.
3. Zum Protease-Verdau im VP2000 Processor wurde das Programm Protease-Verdau ausgewählt. Die Proteaselösung wurde hierdurch auf  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt. Die Objektträger wurden in den vorgesehenen Präparateständer gestellt und in die Roboterarmhalterung eingesetzt. Anschließend wurde das Programm gestartet (Schlegelberger et al., 1999).

### 3.4 FISH-Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde das Sondenassay nach vorangehendem FISH-Verdau des Probenmaterials auf das ausgewählte Hybridisierungsfeld aufgetragen und hybridisiert. Der Hybridisierung schlossen sich Waschverfahren an, um unspezifisch gebundene Sonden sowie solche, die nicht gebunden hatten, zu entfernen. Es folgte eine Gegenfärbung mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI, um neben den locusspezifischen Gensequenzen, die durch das Sondenassay markiert wurden, den restlichen Chromosomensatz farblich darzustellen. Schließlich wurden die Präparate mit Antifade eingedeckt. Hierdurch wurde ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe verhindert.

1. Auf das markierte Hybridisierungsfeld wurden 1,3 µl des Sondenassays mithilfe einer Pipette aufgetragen.
2. Ein der Größe des Hybridisierungsfeldes entsprechendes, im Durchmesser 10 mm betragendes kreisrundes Deckglas wurde mit einer Pinzette auf das Hybridisierungsfeld platziert. Mittels leichten Druckes wurden eingeschlossene Luftblasen unter dem Deckglas herausgedrückt.
3. Das Deckglas und das darunter liegende Hybridisierungsfeld wurden durch Fixogum an den Rändern luftdicht verschlossen.
4. Die Objektträger wurden in eine verschließbare Metallbox gelegt und die Metallbox anschließend in einem Wasserbad bei  $75^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  für 7 Minuten inkubiert. Durch dieses Verfahren wurden die Zellen denaturiert.
5. Die Metallbox wurde 12-72 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank aufbewahrt. Hierbei fand der Hybridisierungsprozess statt.
6. Zum Waschen und Gegenfärben der Präparate wurden das Fixogum und Deckglas vorsichtig entfernt und im VP2000 Processor das Programm Routine-Waschen ausgewählt. Der Waschpuffer wurde hierdurch auf  $75^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt. Die Objektträger wurden in den vorgesehenen Präparateständer gestellt und in die Roboterarmhalterung eingesetzt. Anschließend wurde das Programm gestartet.
7. Zum Eindecken der Objektträger wurden zwei Tropfen des Antifade auf ein Deckglas der Größe 24x60 mm aufgetropft und der Objektträger so daraufgelegt, dass sich Hybridisierungsfeld und Antifade berühren. Durch leichten Druck konnte das Antifade unter dem Deckglas verteilt und eingeschlossene Luftblasen sowie

überschüssiges Antifade durch Austreichen der Objektträger mit einem Zellstofftuch entfernt werden (Schlegelberger et al., 1999).

### 3.5 Vorbehandlung für FISH an Paraffin

Um Paraffinschnitte einer FISH-Hybridisierung zugänglich zu machen, mussten diese mit dem Ziel, die Permeabilität der aufzutragenden Sonden zu erhöhen, vorbereitet werden. Dies wurde erreicht, indem die Schnitte entparaffinisiert, gekocht und einem Verdau durch Proteasen zugeführt wurden.

Zum Entparaffinisieren diente Rotihistol als Ersatz zum toxischen Xylol. Die Schnitte wurden anschließend thermisch behandelt, wodurch Moleküle sowie Molekülkonformationen denaturiert und Antigenstrukturen frei gelegt wurden. Anschließend wurden die Präparate einem enzymatischen Verdau durch Proteasen zugeführt. Durch diese enzymatische Vorbehandlung wurden Bestandteile des Zytoplasmas sowie der Membranen der Zelle und des Zellkerns abgebaut und der spätere Transfer der Sonden in den Zellkern erleichtert sowie ein störender Fluoreszenzhintergrund für die spätere Auswertung verhindert.

Im Rahmen der Arbeit wurden Paraffinschnitte eingesetzt, die als Kontrollen zur Etablierung des Vier-Farb-FISH-Assays an Paraffinschnitten dienten. Zudem handelte es sich bei dem Patientenprobenmaterial ebenfalls um FFPE-Gewebe.

Die einzelnen Arbeitsprozesse gestalteten sich wie im Folgenden aufgeführt.

1. Zum Entparaffinisieren wurden die Objektträger unter dem Abzug jeweils dreimal 5 Minuten lang in mit Rotihistol frischgefüllten Küvetten inkubiert.
2. Anschließend wurden die Objektträger jeweils 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe von 100%, 80% und 70% inkubiert und in einem Metallständer in einer Küvette mit Aqua dest. aufgenommen.
3. Zum Kochen der Objektträger wurde ein 0,01 M Citratpuffer vorbereitet. Der Ansatz wurde in einem Schnellkochtopf zum Sieden gebracht. Die Objektträger wurden darin platziert und der Topf verschlossen. Nachdem ein entsprechender Druck aufgebaut worden war (kenntlich am Dampfaustritt aus dem Deckelventil), wurden die Objektträger weitere 2 Minuten und 40 Sekunden auf höchster Druckstufe gekocht.

4. Nach dem Kochvorgang wurden die Objektträger in laufendem kaltem Leitungswasser abgekühlt und in einer Küvette mit Aqua dest. aufgenommen.
5. Zum Protease-Verdau im VP2000 Processor wurde das Programm Protease-Paraffinverdau ausgewählt. Die Proteaselösung wurde hierdurch auf  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt. Die Objektträger wurden in den vorgesehenen Präparateständer gestellt und in die Roboterarmhalterung des VP2000 Processors eingesetzt. Anschließend wurde das Programm gestartet.

### 3.6 FISH an Paraffinschnitten

An den wie oben beschrieben vorbehandelten Paraffinschnitten erfolgte die Hybridisierung entsprechend der Hybridisierung an Einzelzellkernen. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde bereits im Kapitel 3.3 erklärt.

Vor Beginn der Hybridisierung wurden die Objektträger unter dem Lichtmikroskop nach geeigneten Hybridisierungsfeldern untersucht. Da der Schwerpunkt der Arbeit in der Untersuchung von Lymphfollikeln lag, wurde bei der Auswahl der Schnittpräparate insbesondere das Vorhandensein von Lymphfollikeln berücksichtigt.

Zu beachten war bei der Wahl des zu hybridisierenden Schnittpräparates außerdem, dass der Schnitt möglichst homogen und überlagerungsfrei erschien, da bei Schnittpräparaten per se Schnittartefakte entstehen und diesem Umstand durch die Auswahl einer geeigneten Schnittebene Rechnung getragen werden kann. Die Größe des Hybridisierungsfeldes unterschied sich je nach Größe des Biopsats. In der Regel wurde das gesamte Biopsat in die Hybridisierung eingeschlossen.

1. Zum Markieren des Hybridisierungsfeldes wurde mit einem Diamantschreiber das ausgewählte Areal auf der Rückseite des Objektträgers markiert. Die aufzutragende Sonde wurde ebenfalls auf dem Objektträger beschriftet.
2. Bei einem kleinen Hybridisierungsfeld wurden  $1,3\text{ }\mu\text{l}$  des Sondenassays eingesetzt. Ein im Durchmesser 10 mm betragendes kreisrundes Deckglas wurde mit einer Pinzette auf das Hybridisierungsfeld platziert. Bei einem größeren Areal wurden  $3\text{ }\mu\text{l}$  des Sondenassays aufgetropft und ein quadratisches  $18 \times 18\text{ mm}$  messendes Deckglas aufgesetzt. Mittels leichten Druckes wurden eingeschlossene Luftblasen unter dem Deckglas herausgedrückt.

3. Die Deckglasränder wurden durch reichlich Fixogum an den Rändern luftdicht verschlossen. Die Objektträger wurden in eine verschließbare Metallbox gelegt und die Metallbox anschließend in einem Wasserbad bei  $85^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  für 30-35 Minuten inkubiert.
4. Die Metallbox wurde anschließend 72 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank aufbewahrt.
5. Zum Waschen, Gegenfärben und Eindecken der Präparate wurden die Paraffinpräparate wie in Kapitel 3.3.6 und 3.3.7 behandelt.

### 3.7 Auswertung FISH

Die Proben wurden mit den Fluoreszenzmikroskopen Zeiss-Axioskop, Zeiss-Axioplan und Zeiss-Axio-Imager mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern ausgewertet und mit der Isis Software von Metasystems dokumentiert.

Bei Gewebeproben, die in Form von FFPE-Schnitten vorliegen, kann es durch Schnittartefakte zu falsch-positiven Ergebnissen kommen (Giefing and Siebert, 2013). Dazu zählen Signalkonstellationen, in denen ein kolokalisiertes, normales Signalpaar und ein einzelnes Sondensignal vorliegen. Bei einer translokationspositiven Zelle kann das zugehörige, translozierte Sondensignal durch die gewählte Schnittebene entfernt worden sein, aber auch der Verlust derivativer Chromosomen stellt in B-Zellneoplasien ein wiederkehrendes Phänomen dar. Ergibt sich eine solche Signalkonstellation nun in einer gesunden Zelle, handelt es sich dabei um ein falsch-positives Ergebnis. Da auch normale *MYC*- und *IGH*-Signale abhängig vom Kondensationszustand der DNA als leicht getrennt erscheinen und ein Bruchereignis suggerieren können, definierten wir ein positives Bruchereignis als ein solches, wo der Signalabstand der BAP zwei Signaldurchmesser überschritt. *t(8;14)/MYC-IGH*-positive Zellen ergaben dabei meist sehr deutlich getrennte Signale.

Den oben genannten Umständen wurde Rechnung getragen, indem wir Nachweisgrenzen für bestimmte Signalkonstellationen definierten. Die Nachweisgrenze wird standardmäßig errechnet, indem zum Mittelwert des Anteils falsch-positiver Signalkonstellationen in Proben fünf gesunder Kontrollpersonen die dreifache Standardabweichung addiert wurde (Ventura et al., 2006).

Die Ergebnisse jeder Hybrisierung wurden durch eine zweite erfahrene Person aus dem Institut für Humangenetik re-evaluiert.

## 4 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob die die BL definierende *MYC*-Translokation in den B-Zellen von histomorphologisch nicht-neoplastischen Peyer Plaques entstehen könnte. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die Mehrheit der Fälle des sBL angeführt von der Ileozökalregion mit intraabdominellen Krankheitsmanifestationen einhergeht und die Lymphome histologisch zum Teil aus den Keimzentrums-B-Zellen in den Peyer Plaques der Ileozökalregion hervorzugehen scheinen. Um zu analysieren, ob *MYC*-Translokationen in Peyer Plaques im Zuge der physiologischen B-Zell-Reifung entstehen, sind nicht-neoplastische Gewebeproben von Patienten auf diese Veränderung untersucht worden. Die FISH-Analysen wurden an FFPE-Schnitten durchgeführt, um die *MYC*-Translokation gegebenenfalls einem Zellkompartiment direkt zuordnen zu können. Ein möglicher Nachweis und die Zuordnung maligner Transformationen zu bestimmten B-Zell-Populationen könnte einen Beitrag zum Verständnis der Entstehung des sBL leisten.

Wie bereits im anführenden Teil erläutert, nimmt man heutzutage an, dass jedem BL eine Translokation des Protoonkogens *MYC* unterliegt. Weitaus am häufigsten lässt sich eine reziproke Translokation der langen Arme der Chromosomen 8 und 14 nachweisen:  $t(8;14)/MYC-IGH$ . Zum Screening hinsichtlich der ausgewählten Translokation ist die Interphase-FISH mit einem Vier-Farb-FISH-Assay aus Bruchpunkt-flankierenden Sonden gewählt worden. Zur Charakterisierung der Bruchpunktregion 14q32 des *IGH*-Locus wurden selbsthergestellte SpectrumAqua-markierte Sonden ausgewählt, die proximal bzw. zentromerisch des *IGH*-Locus binden. Zur Darstellung des Bereiches distal beziehungsweise telomerisch des *IGH*-Locus wurde eine kommerzielle SpectrumGold-markierte Sonde gewählt (s. Kapitel 3.1). Zunächst wurde an Metaphasen von gesunden Spendern die korrekte Lage der Sonden untersucht. Für die Bruchpunktregion 8q24 ist eine kommerzielle *MYC*-BAP Sonde gewählt worden (s. Kapitel 3.1). Diese besteht aus einer SpectrumOrange-markierten, proximal beziehungsweise zentromerisch des *MYC*-Gens sowie einer SpectrumGreen-markierten, distal beziehungsweise telomerisch des *MYC*-Gens bindenden Sonde. Unter diesem Assay mit den vier unterschiedlich markierten Sonden vereint ein positives Ergebnis sowohl ein Bruchereignis innerhalb des *MYC*-Gens und des *IGH*-Gens, als auch ein Fusionsereignis  $t(8;14)/MYC-IGH$  auf den beiden derivativen Chromosomen 8 und 14. Durch das gemeinsame Auftreten von zwei Bruch- und zwei Fusionsereignissen sollen falsch-positive Ergebnisse verringert werden. Damit



wird auch berücksichtigt, dass durch die Schnittverfahren falsch-positive Ergebnisse erzeugt werden können, wenn dadurch beispielsweise Einzelsignale erzeugt werden. Ein Fusionsereignis auf zwei derivativen Chromosomen kann bei falsch-positiven Fällen allerdings nicht nachgewiesen werden.

## **4.1 Etablierung des Vier-Farb-FISH-Assays an Kontrollproben**

### **4.1.1 Ermittlung/Berechnung der Nachweisgrenzen an negativen Kontrollproben**

Als Kontrollen des Vier-Farb-FISH-Assays wählten wir Proben von Zellen aus dem pB fünf gesunder, männlicher Kontrollpersonen (Abbildung 4.4). Als negative FFPE-Kontrollen eigneten sich Routinepräparate von normalem lymphatischem Gewebe. FFPE-Proben von vier Lymphadenitiden und einem Beckenkammpräparat wurden verwendet.

Diagnostisch wurde so vorgegangen, dass die zu untersuchenden Kontrollen auf ein Bruchereignis hinsichtlich des *MYC*-Locus zuerst gescreent wurden. Lag ein mögliches Bruchereignis vor, ist über die entsprechenden Filtervorsätze (SpectrumAqua und SpectrumGold) untersucht worden, ob gleichzeitig ein Bruch im *IGH*-Locus und gleichzeitig eine t(8;14)/*MYC-IGH*-Fusion zwischen den *MYC* und *IGH*-Loci vorlag. Gab es keinen Hinweis auf einen Bruch im *MYC*-Gen, erfolgte dementsprechend keine weitere Untersuchung des *IGH*-Locus oder der t(8;14)/*MYC-IGH*-Fusion. In den unten zusammengefassten Tabellen wird für diesen Fall die Signalkonstellation „1 Ko-MYC/ 2 Ko-MYC“ (1 oder 2 kolokalisierte Signale des *MYC*-Gens) angegeben.

Zunächst wurden die Sonden auf die Proben hybridisiert und anschließend in jeweils 1000 Zellen die Anzahl der kolokalisierten Signalpaare sowie abweichende Signalkonstellationen bestimmt. Da auffällige Signalkonstellationen nicht verlässlich und signifikant sind, wenn sie nur in einer einzelnen Zelle auftreten, wurden an den negativen Kontrollen Nachweisgrenzen berechnet (s. Kapitel 3.7). Wird die Nachweisgrenze überschritten, kann dies ein Hinweis auf eine Strukturveränderung geben.

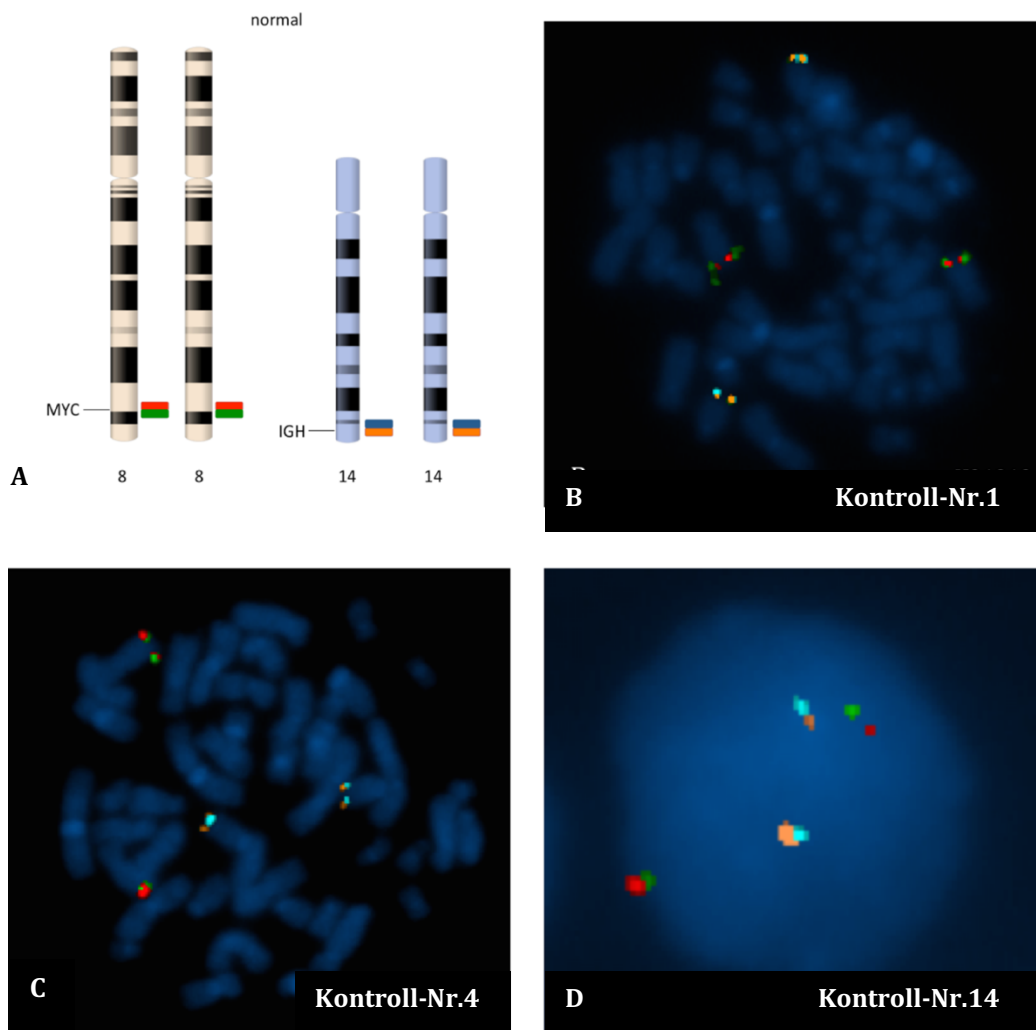
Ein Signalsplit wurde als Signalabstand der *MYC*-BAP von mehr als zwei Signaldurchmessern definiert. Daraus wurde eine Nachweisgrenze von 3‰ für das Auftreten von Einzelsignalen berechnet (Tabelle 4.1). Innerhalb der Kontrollreihe aus pB sind in einer Probe zwei Zellen mit der Signalkonstellation aus einem kolokalisierten Signalpaar (1Ko-MYC) und einem Einzelsignal für je den distalen und proximalen Anteil

von *MYC* ohne weitere Hinweise auf einen *IGH*-Bruch respektive die t(8;14)/*MYC*-*IGH* beobachtet worden (s. Kontrollnummer 4).

**Tabelle 4.1:** Bestimmung der Nachweisgrenzen (NWG) für das Vier-Farb-FISH-Assay in Bezug auf abweichende Signalkonstellationen in der Kontrollreihe aus pB mit dem Karyotyp 46,XY.

Kontroll-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	2Ko-MYC	1Ko-MYC	3Ko-MYC	1Ko-MYC +1gr	1Ko-MYC +1ro
1	1000	999	1	-	-	-
2	1000	998	2	-	-	-
3	1000	996	-	4	-	-
4	1000	996	2	-	1 (+2Ko-IGH)	1 (+2Ko-IGH)
5	1000	999	1	-	-	-
Mittelwert			1,2	0,8	0,2	0,2
Standardabweichung			0,8	1,6	0,5	0,5
Errechnete NWG in ‰			3,4	5,6	1,5	1,5

Kontroll-Nr.: Kontrollnummer; Ko: Kolokalisation; gr: grün; ro: rot



**Abbildung 4.1: Negative Kontrollen an pB.** A: Ideogramm der Chromosomen 8 und 14 im diploiden Chromosomensatz. B (Kontroll-Nr. 1) und C (Kontroll-Nr. 4) Metaphase-FISH aus der Reihe der Chromosomensatz. D (Kontroll-Nr. 14) Metaphase-FISH aus der Reihe der Chromosomensatz.

Zellsuspensionen ohne t(8;14)/*MYC-IGH* mit regelhafter Kolokalisation der Sondenpaare für *IGH* (Blau/Gold) und *MYC* (Rot/Grün). **D** (Kontroll-Nr. 14) Interphase-FISH einer Zelle aus einem Beckenkamltrepanat ohne t(8;14)/*MYC-IGH* mit vier regelhaften Kolokalisationen (siehe B/C).

Anschließend ist das Assay auf FFPE-Schnitte fünf verschiedener lymphatischer Gewebe hybridisiert worden. Darunter zeigte sich in 3 Zellen die Signalkonstellation aus einem 1Ko-MYC und einem Einzelsignal für den distalen Anteil von *MYC* und in weiteren 3 Zellen jeweils ein Einzelsignal für den distalen Anteil von *MYC* ohne zusätzliche Kolokalisationen. Hinweise auf einen *IGH*-Bruch bestanden nicht. Die Nachweisgrenze für das Auftreten eines Einzelsignals für die Anteile von *MYC* bei FFPE-Geweben berechnete sich auf 6‰. Ein einzelner Signalsplit für *MYC* ohne eine zweite *MYC*-Kolokalisation wurde in zwei Zellen der Kontrollnummer 15 detektiert. Somit errechnete sich für einen Signalsplit eine Nachweisgrenze von 3‰. Beide Zellen zeigten kein Fusionsignal für die Sonden, die an den *IGH*-Locus hybridisieren (Tabelle 4.2).

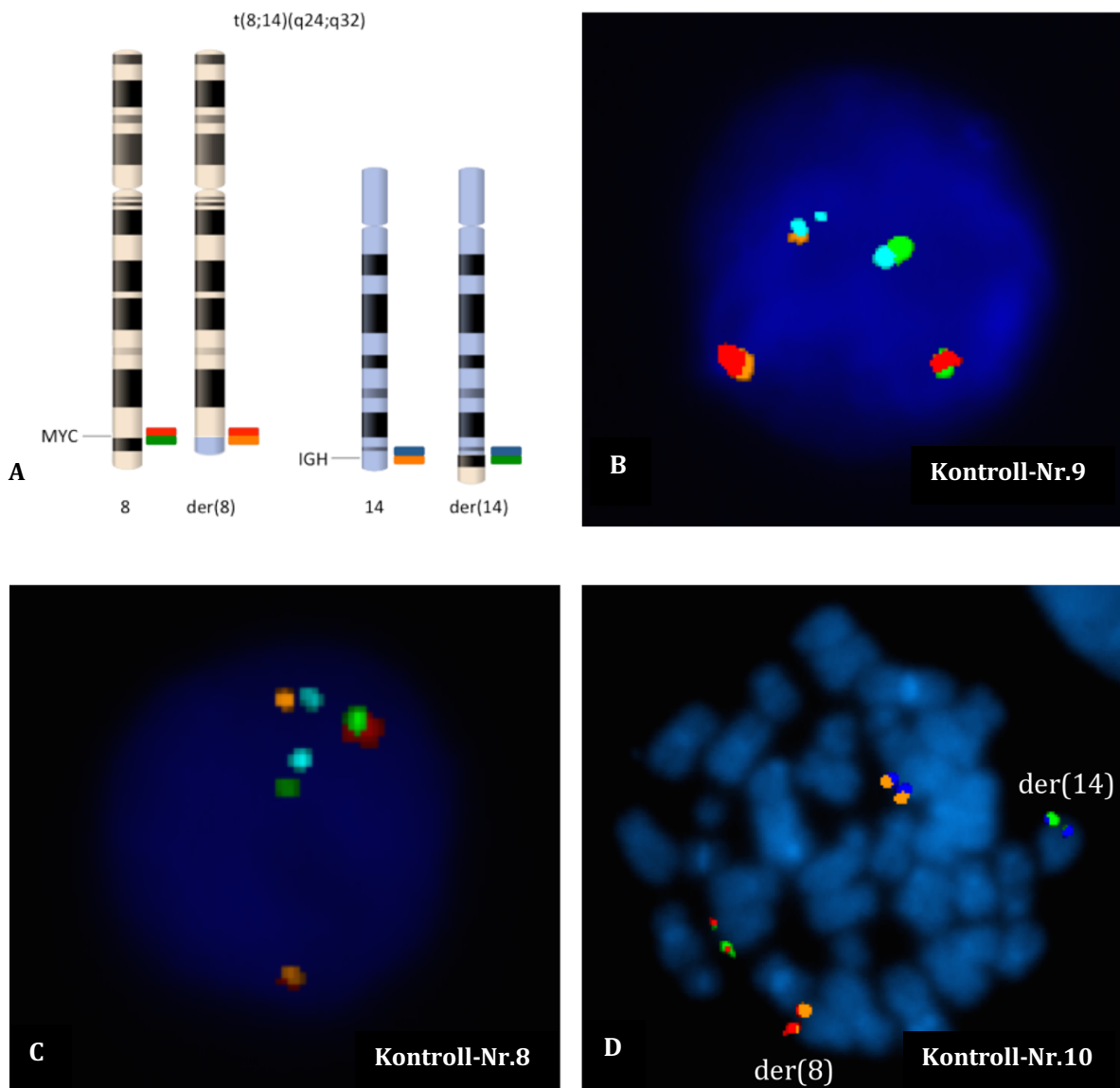
**Tabelle 4.2:** Bestimmung der Nachweisgrenzen (NWG) für das Vier-Farb-FISH-Assay in Bezug auf abweichende Signalkonstellationen in der negativen Kontrollreihe lymphatischer FFPE-Gewebe.

Kontroll-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	2Ko-MYC	1Ko-MYC	3Ko-MYC	1Ko-MYC 1gr	1gr	1gr 1ro
11	1000	781	218	-	1 (+2Ko-IGH)	-	-
12	1000	704	296	-	-	-	-
13	1000	726	270	-	2 (+2Ko-IGH)	2	-
14	1000	673	327	-	-	-	-
15	1000	496	500	-	1	1 (+1Ko-IGH)	2 (+0Ko-IGH)
Mittelwert				-	0,6	0,6	0,4
Standardabweichung				-	0,6	0,9	0,9
Errechnete NWG in ‰				-	2,4	3,3	3,1

Kontroll-Nr.: Kontrollnummer; Ko: Kolokalisation; gr: grün; ro: rot

#### 4.1.2 Validierung des Vier-Farb-FISH-Assays an positiven Kontrollproben

Als positive Kontrollen dienten Zellen aus fünf bekannten BL-Zelllinien sowie FFPE-Schnitte von fünf verschiedenen Geweben mit molekularzytogenetisch gesicherter t(8;14)/*MYC-IGH*. In der Kontrollreihe bestehend aus den t(8;14)/*MYC-IGH*-positiven Zellen zeigte sich in jeweils zehn untersuchten Zellen neben einer Kolokalisation für das *MYC*-Gen ein deutliches Signalsplit inform eines separierten roten und grünen Signals. Gleichzeitig konnte ein Signalsplit für den *IGH*-Locus und die Fusion mit den entsprechenden Signalen des *MYC*-Gens bestätigt werden (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.2: Positive Kontrollen.** Alle Beispiele enthalten die Sondenkonstellation 1Ko-MYC+1Ko-IGH+2Fus-MYC/IGH. **A** Ideogramm der Translokation t(8;14)/MYC-IGH im diploiden Chromosomensatz. **B** (Kontroll-Nr. 9) und **C** (Kontroll-Nr. 8): Interphase-FISH aus der Reihe der BL-Zelllinien mit t(8;14)/MYC-IGH. **D** (Kontroll-Nr. 10): Metaphase-FISH mit t(8;14)/MYC-IGH. Die derivativen Chromosomen sind gekennzeichnet. Daneben sind jeweils ein intakter MYC- und IGH-Locus erkennbar.

In der BL-Zelllinie Daudi mit der Kontrollnummer 6 konnte in neun von zehn Zellen ein zweifaches Translokationsereignis (1Ko-MYC+3Fus-MYC/IGH+1Ko-IGH) beobachtet werden, welches eine Aneuploidie bzw. eine Duplikation, also eine Vermehrung einzelner Chromosomen, der an der Translokation beteiligten Gensequenzen nahe legt. Insgesamt betrug der Anteil der t(8;14)/MYC-IGH-positiven Zellen somit 100% (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3:** Bestimmung der Signalkonstellationen in der Kontrollreihe aus fünf BL-Zelllinien mittels Vier-Farb-FISH.

Kontroll-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	2Ko-MYC	1Ko-MYC	3Ko-MYC	1Ko-MYC 1gr 1ro	1Ko-MYC 2gr 1ro
6	10	-	-	-	1 (+2Fus+1Ko-IGH)	9 (+3Fus+1Ko-IGH)
7	10	-	-	-	10 (+2Fus+1Ko-IGH)	-
8	10	-	-	-	10 (+2Fus+1Ko-IGH)	-
9	10	-	-	-	10 (+2Fus+1Ko-IGH)	-
10	10	-	-	-	10 (+2Fus+1Ko-IGH)	-

Kontroll-Nr.: Kontrollnummer; Ko: Kolokalisation; gr: grün; ro: rot; Fus: Fusion

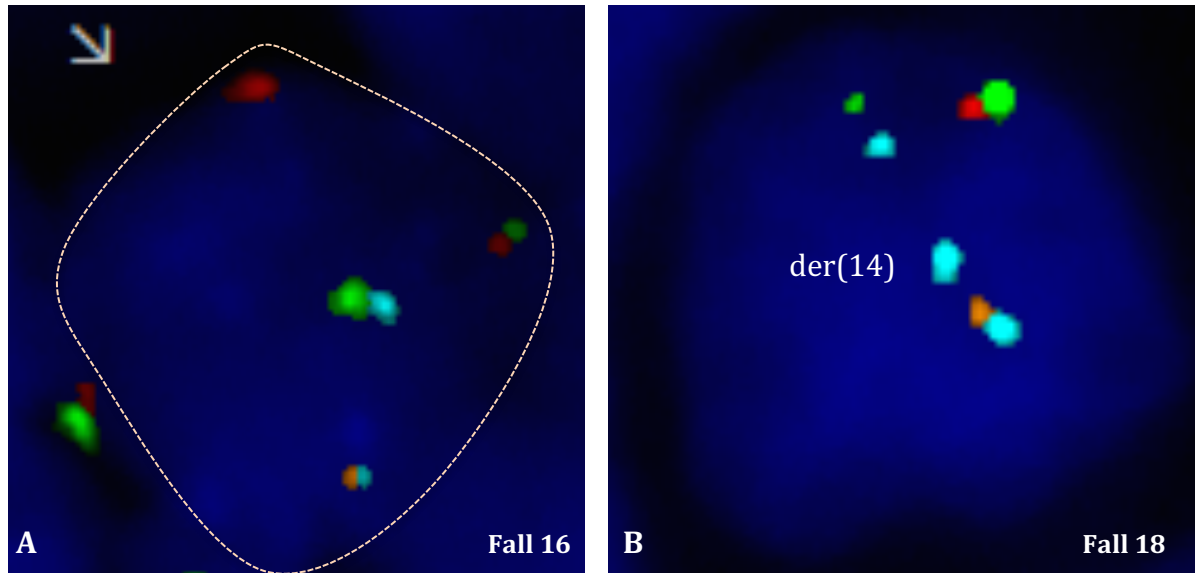
In der Kontrollreihe bestehend aus den fünf t(8;14)/MYC-IGH-positiven Geweben wurden jeweils 20 Interphasezellkerne ausgezählt. Es zeigten sich verschiedene Konstellationen von Signalsplits (Tabelle 4.4). Das getrennte Auftreten beider MYC-Signale oder aber eines Einzelsignals der jeweils proximalen (rot) oder distalen (grün) Sonde wiesen auf ein Bruchereignis im MYC-Gen hin. Das Bruchereignis konnte mit oder ohne eine Ko-MYC auftreten. In allen untersuchten Zellen waren die Sondensignale der MYC-BAPs mit den entsprechenden Sondensignalen der IGH-Sonden fusioniert. Der Anteil der t(8;14)/MYC-IGH-positiven Zellen betrug in allen Kontrollen somit 100% (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4:** Bestimmung der Signalkonstellationen in der Kontrollreihe aus fünf t(8;14)/MYC-IGH-positiver FFPE-Gewebe mittels Vier-Farb-FISH.

Kontroll-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	2Ko-MYC	1Ko-MYC	3Ko-MYC	1Ko-MYC 1gr	1Ko-MYC 1ro	1gr	1gr 1ro	1Ko-MYC 1gr 1ro
16	20	-	-	-	4 (+1Fus) 2 (+1Fus+1Ko-IGH)	-	4 (1Fus+1Ko-IGH)	3 (+2Fus) 2 (+2Fus+1Ko-IGH)	4 (+2Fus+1Ko-IGH) 1 (+2Fus)
17	20	-	-	-	9 (+1Fus) 7 (+1Fus+1Ko-IGH)	-	-	1 (+2Fus+1Ko-IGH)	1 (+2Fus+1Ko-IGH) 2 (+2Fus)
18	20	-	-	-	1 (+1Fus+1Ko-IGH) 1 (+1Fus)	-	-	1 (+2Fus)	16 (+2Fus+1Ko-IGH) 1 (+2Fus)
19	20	-	-	-	4 (+1Fus+1Ko-IGH) 2 (+1Fus)	-	-	1 (+2Fus) 1 (+2Fus+1Ko-IGH)	10 (+2Fus+1Ko-IGH) 2 (+2Fus)
20	20	-	-	-	5 (+1Fus+1Ko-IGH)	3 (+1Fus+1Ko-IGH) 1 (+1Fus)	-	3 (+2Fus+1Ko-IGH)	7 (+2Fus+1Ko-IGH) 1 (+2Fus)

Kontroll-Nr.: Kontrollnummer; Ko: Kolokalisation; Ko: Kolokalisation; gr: grün; ro: rot; Fus: Fusion

Die Anwendung des Assays an den FFPE-Kontrollen konnte zeigen, dass aberrante Zellen, die durch Schnittartefakte ihre Signale verloren haben, dennoch in der Untersuchung berücksichtigt und interpretiert werden konnten (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.3: Ergebnis der Kontrollkohorte.** A (Kontroll-Nr. 16) und B (Kontroll-Nr. 18): FISH aus der Reihe der t(8;14)/MYC-IGH-positiver Gewebe. Schnittbedingt sind nicht alle vorhandenen Signalpaare abgebildet. Gestrichelte Linie = Zellkerngrenze. der(14): derivatives Chromosom 14.

Im Folgenden ist bei der Auswertung der FISH-Signale versucht worden, möglichst solche Areale auszuwählen, in denen die Zellmorphologie gut einsehbar ist und die Zellen nicht übermäßig überlagert sind. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass die Areale kräftige, scharf abgrenzbare Fluorochromsignale und wenig Hintergrundrauschen enthielten. Die Qualität einer Gewebeprobe konnte innerhalb der Schnittebene stark variieren.

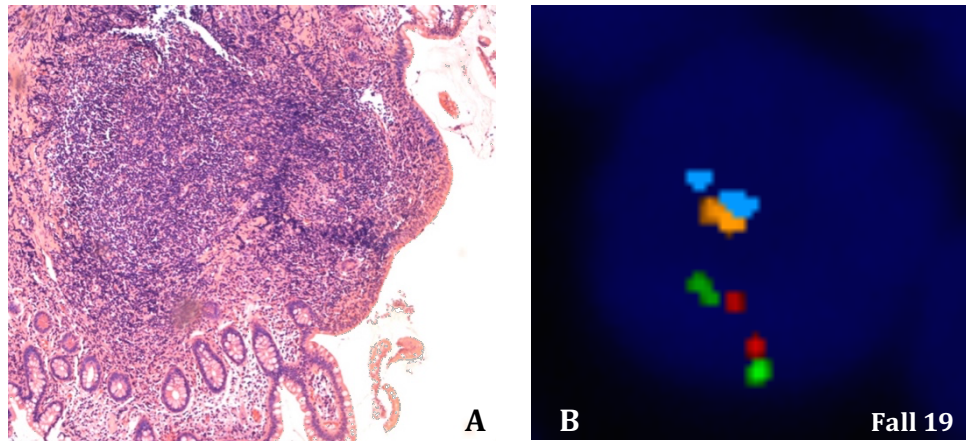
## 4.2 Anwendung des Vier-Farb-FISH-Assays an den ausgewählten Proben gesunder Probanden

Insgesamt wurden FFPE-Gewebe von 25 Probanden ausgewählt. 15 der Patienten waren weiblich, 10 unter ihnen männlich. Der Altersmedian bei Probenentnahme betrug 17 Jahre, der Bereich der Altersverteilung reichte von 48 Stunden bis zu 20 Jahren. In Anlehnung an bereits erfolgte Studien, wo eine Alterskorrelation gezeigt werden konnte (s. Kapitel 1.2.7.1), teilten wir die Kohorte in drei Altersgruppen ein: die Neonatalperiode (0-28 Tage), Säuglingsperiode (28 Tage-1 Jahr) und die Adoleszenz, unterteilt in zwei Altersgruppen (10-18 Jahre und 19-21 Jahre). Die patientenbezogenen klinischen Daten und pathohistologischen Diagnosen können der Tabelle 2.1.2 im Kapitel Material entnommen werden.

Das Vier-Farb-FISH-Assay wurde auf die Gewebeschnitte hybridisiert und anschließend der gesamte Schnitt auf die Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  hin untersucht. Solche Gewebe, die in einer ersten Hybridisierung keine Signale zeigten, wurden einer zweiten Hybridisierung unterzogen (Fälle 2, 9 und 15). Bei 8 der 25 Gewebeproben konnte nach dem dritten Hybridisierungsversuch keine erfolgreiche Hybridisierung nachgewiesen werden und dementsprechend keine Auswertung erfolgen.

Siebzehn erfolgreich hybridisierte Gewebeschnitte wurden unter Berücksichtigung der Gewebearchitektur untersucht, sodass getrennte Auszählungen des Epithels, des Stromas sowie der Lymphfollikel erfolgten. Es wurde versucht, in der Summe mindestens 1000 Zellen in die Auswertung einzubeziehen. In zwei Fällen konnten nur weniger als 200 Zellen ausgewertet werden. Unter den 17 Gewebeproben lieferten 8 Proben eindeutige, negative Ergebnisse. Den Gewebeproben war gemein, dass sie eine gute, konservierte Gewebestruktur aufwiesen: Die Epithelien waren klar abgrenzbar und kontinuierlich verfolgbar. Oft ließen sich knapp unterhalb des Epithels Follikel mit oder ohne Keimzentren beobachten, die die Epithelstruktur auflockerten.

Die Qualität der Hybridisierung war in der Regel sehr gut. Eine hohe Qualität ergab sich, wenn die Signale des *MYC*-BAP-Sondenassays, welche die leitenden Signale des Screenings darstellten, ohne das Durchleuchten der übrigen Sonden signale, insbesondere der Goldsignale des *IGH*-Sondenassays, einsehbar waren. Zusätzlich lieferten satte, kräftig fluoreszierende Sonden signale und das Fehlen von störenden Farbpigmenten oder von unspezifischen Anfärbungen bindegewebiger Strukturen gute Untersuchungsbedingungen. Unter diesen Bedingungen wurden insgesamt knapp über 15.800 Zellen in den Präparaten mit den Fallnummern 1, 3, 6, 12, 16, 17, 18 und 19 gescreent. Sie zeigten ein oder zwei kolokalisierte Signalpaare des *MYC* BAP-Assays entsprechend 1Ko-MYC oder 2Ko-MYC (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.4: Fallnummer 19.** **A** Histologisches Präparat. HE-Färbung. **B** Interphase-FISH in Falschfarbdarstellung regelhafter Kolokalisation der Sondenpaare Blau/Gold und Rot/Grün ohne  $t(8;14)/MYC-IGH$ .

In einigen Fällen konnten Einzelsignale beobachtet werden, eine Translokation war in diesen Fällen nicht nachweisbar. Da der Anteil der Einzelsignale unterhalb der Nachweisgrenze von 6‰ lag, wurde dieser als nicht signifikant gewertet. Die Präparate wurden bezüglich der Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  als negativ gewertet. Eine genaue Auflistung der Ergebnisse erfolgt in unten aufgeführten Tabellen 4.5, 4.6, 4.7 und 4.8.

Im Folgenden wird auf die Fälle eingegangen werden, die abweichende Signalkonstellationen für Einzelzellen aufwiesen. Nebst der inhaltlichen Frage nach dem sporadischen Vorkommen von  $t(8;14)/MYC-IGH$ -positiven Zellen soll somit ein tieferer Einblick in die praktische Anwendung des neu etablierten Vier-Farb-FISH-Assays wiedergegeben werden.

**Tabelle 4.5:** Ergebnisse des Interphase-FISH-Screenings mittels Vier-Farb-FISH der Biopsien der Patienten in der Neonatalperiode (0-28 Tage) nach der Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$ .

Fall-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	Lokalisation	Anzahl der Zellen mit entsprechender Signalkonstellation		Interpretation
			2Ko-MYC	1Ko-MYC	
6	2100, davon				neg
	300	Epithel	201	99	
	300	Stroma	224	76	
	1500	Follikel	1097	403	
13	< 200	Epithel Stroma Follikel	< 200		neg
23	n.a.				n.a.

Fall-Nr.: Fallnummer; Ko: Kolokalisation; neg: negativ; n.a.: nicht auswertbar



**Tabelle 4.6:** Ergebnisse des Interphase-FISH-Screenings mittels Vier-Farb-FISH der Biopsien der Patienten in der Säuglingsperiode (1-12 Monate) nach der Translokation t(8;14)/*MYC-IGH*.

Fall-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	Lokalisation	Anzahl der Zellen mit entsprechender Signalkonstellation		Interpretation
			2Ko-MYC	1Ko-MYC	
22	< 200	Epithel Stroma Follikel	< 200		neg
24	n.a.				n.a.

Fall-Nr.: Fallnummer; Ko: Kolokalisation; neg: negativ; n.a.: nicht auswertbar

# Ergebnisse

**Tabelle 4.7:** Ergebnisse des Interphase-FISH-Screenings mittels Vier-Farb-FISH der Biopsien der Patienten in der Altersgruppe 10-18 Jahre nach der Translokation t(8;14)/MYC-IGH.

Fall-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	Lokalisation	Anzahl der Zellen mit entsprechender Signalkonstellation											Interpretation
			2Ko-MYC	1Ko-MYC	2Ko-MYC 1gr	1Ko-MYC 1gr 1ro	1Ko-MYC 2gr	1Ko-MYC 1gr	1Ko-MYC 1ro	2gr	1gr	1gr 1ro	1ro	
2	1400, davon													
	100	Epithel	59	41										
	200	Stroma	160	40										
	900	Follikel 1	730	170										
	100	Follikel 2	87	13										
	100	Follikel 3	80	20										
2W						1 (+1Ko-IGH)		1						neg
3	2100, davon													neg
	300	Epithel	186	114										
	300	Stroma	184	116										
	500	Follikel 1	251	249										
	1000	Follikel 2	508	492										neg
4	1587, davon													
	100	Epithel	65	32					1	1	1			
	100	Stroma	65	33				1 (+IGH-prox)					1 (+1Ko-IGH)	
	1397	Follikel	832	527	1 (+1Ko-IGH)	2 (+1Ko-IGH)		12 11 (+1Ko-IGH)	3 2 (+1Ko-IGH)		5 1 (+1Ko-IGH) 1 (+2Ko-IGH)			

# Ergebnisse

Fall-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	Lokalisation	Anzahl der Zellen mit entsprechender Signalkonstellation											Interpretation
			2Ko-MYC	1Ko-MYC	2Ko-MYC 1gr	1Ko-MYC 1gr 1ro	1Ko-MYC 2gr	1Ko-MYC 1gr 1ro	1Ko-MYC 1ro	2gr	1gr	1gr 1ro	1ro	
8	n.a.													n.a.
9	2099, davon													Wdh.
	300	Epithel	199	101										
	300	Stroma	194	105				1 (+1Ko-IGH+1Fus)						
	1499	Follikel	1076	421				1			1 (+2Ko-IGH)			
9W								1 1 (+1Fus) 1 (+IGH-prox)			1 (+2Ko-IGH)	6		neg
10	n.a.													n.a.
14	1700, davon													neg
	300	Epithel	127	173										
	300	Stroma	140	160										
	1100	Follikel	513	587										
16	2000, davon													neg
	300	Epithel	207	92				1 (+2Ko-IGH)						
	300	Stroma	219	81										
	1100	Follikel 1	827	273										
	300	Follikel 2	254	46										

# Ergebnisse

Fall-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	Lokalisation	Anzahl der Zellen mit entsprechender Signalkonstellation											Interpretation
			2Ko-MYC	1Ko-MYC	2Ko-MYC 1gr	1Ko-MYC 1gr 1ro	1Ko-MYC 2gr	1Ko-MYC 1gr 1ro	1Ko-MYC 1ro	2gr	1gr	1gr 1ro	1ro	
<b>17</b>	2600, davon													neg
	100	Epithel	67	33										
	200	Stroma	152	48										
	500	Follikel 1	373	127										
	300	Follikel 2	238	61							1 (+2Ko-IGH)			
	1200	Follikel 3	891	307					1		1 (+1Ko-IGH)			
	300	Follikel 4	227	73										
<b>18</b>	1118, davon													neg
	118	Epithel	86	32										
	200	Stroma	170	30										
	400	Follikel 1	295	105										
	100	Follikel 2	85	15										
	300	Follikel 3	237	63										
<b>21</b>	1596, davon													neg
	200	Epithel	127	72					1					
	100	Stroma	55	44					1 (+2Ko-IGH)					
	1296	Follikel	839	450	1 (+2Ko-IGH)		2 (+1Ko-IGH)	1 (+2Ko-IGH)	1 (+1Ko-IGH) 1 (+2Ko-IGH)					

Fall-Nr.: Fallnummer; Ko: Kolokalisation; Fus: Fusion; gr: grün; ro: rot; IGH-prox: proximaler Anteil des IGH-Sondenassays, entspricht einem Spectrum aqua-Signal; neg: negativ; n.a.: nicht auswertbar; Wdh.: Wiederholung

**Tabelle 4.8:** Ergebnisse des Interphase-FISH-Screenings mittels Vier-Farb-FISH der Biopsien der Patienten in der Altersgruppe 19-21Jahre nach der Translokation t(8;14)/MYC-IGH.

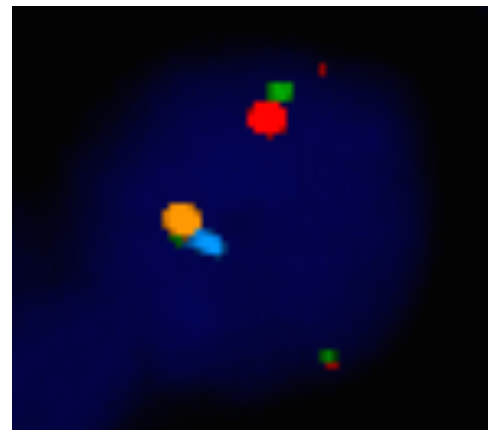
Fall-Nr.	Ausgewertete Zellkerne	Lokalisation	Anzahl der Zellen mit entsprechender Signalkonstellation						Interpretation
			2Ko-MYC	1Ko-MYC	2Ko-MYC 1gr	1Ko-MYC 1gr	1gr 2ro	0Ko	
<b>1</b>	1800, davon								neg
	400	Epithel	264	135	1 (+1Ko-IGH)				
	300	Stroma	213	86				1 (+1Ko-IGH)	
	1100	Follikel	788	312					
<b>5</b>	n.a.								n.a.
<b>11</b>	n.a.								n.a.
<b>12</b>	1999, davon								neg
	100	Epithel	48	52					
	200	Stroma	105	94		1			
	500	Follikel 1	274	226					
	499	Follikel 2	290	208		1			
	300	Follikel 3	196	104					
	400	Follikel 4	236	164					
<b>15</b>	1899, davon								neg
	100	Epithel	54	46					
	199	Stroma	108	90		1 (+1Ko-IGH)			
	800	Follikel 1	488	312					
	800	Follikel 2	473	327					
<b>15W</b>			1 (+1Ko-IGH)	1 (+1Ko-IGH) 1 (+5Ko-IGH)		1 (+1Ko-IGH)			neg
<b>19</b>	2100, davon								neg
	300	Epithel	217	83					
	300	Stroma	229	71					
	1600	Follikel	1246	354					
<b>20</b>	n.a.								n.a.
<b>25</b>	2100, davon								
	300	Epithel	169	131					
	300	Stroma	159	141					
	1500	Follikel	900	598			1 (+2IGH-dist)		

Fall-Nr.: Fallnummer; Ko: Kolokalisation; gr: grün; ro: rot; IGH-dist: distaler Anteil des IGH-Sondenassays, entspricht einem Spectrum Gold-Signal; neg: negativ; n.a.: nicht auswertbar

#### 4.2.1 Vorkommen und Interpretation abweichender Signalkonstellationen an den ausgewählten Proben gesunder Probanden

In zwei Fällen des Kollektivs, den Präparaten mit den Fallnummern 13 und 22, schloss sich eine dritte Hybridisierung an, nachdem in zwei Anläufen nicht die gesamte Hybridisierungsfläche erfolgreich hybridisiert worden war. Dabei handelte es sich um große Resektate aus dem terminalen Ileum. Auch im dritten Hybridisierungsversuch stellten sich Areale mit und ohne Hybridisierung dar. Es zeigte sich eine reiche Infiltration des Gewebes durch Entzündungszellen. Lymphfollikel waren nicht abgrenzbar. Eine Auszählung von Epithel- und Stromazellen lieferte in beiden Präparaten jeweils unter 200 Zellen. Es stellten sich 1Ko-MYC oder 2-Ko-MYC für das *MYC*-BAP-Assay dar. Die Präparate wurden dementsprechend als negativ eingestuft.

Im Präparat mit der Fallnummer 2 stellte sich das Darmgewebe mit Sekundärfollikeln dar. Eine erste Auswertung erfolgte an 1400 Zellen. Davon entfielen 100 Zellen auf das Epithel, 200 Zellen auf das Stroma und weitere 1100 Zellen auf drei verschiedene Follikel. Die Zellen beinhalteten ein bis zwei Ko-MYC (Abbildung 4.8). Eine Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  konnte nicht identifiziert werden. In einer Zelle wurde ein Einzelsignal der distalen *MYC*-BAP Sonde ohne Hinweis auf ein *IGH*-Bruchereignis gezeigt (Tabelle 4.7 Fall 2). In einer weiteren Zelle ließen sich



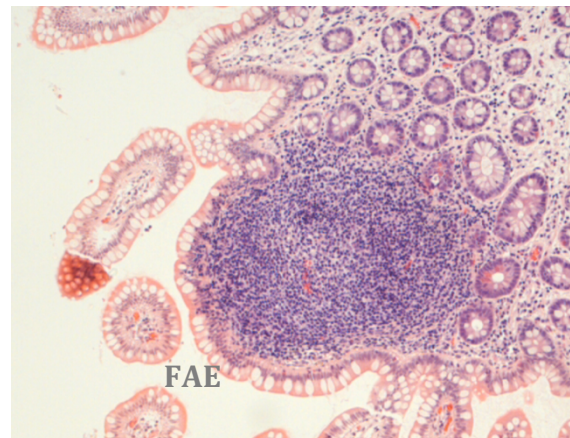
**Abbildung 4.5: Fallnummer 2.** Falschfarbdarstellung eines Vier-Farb-FISH-Assay zeigt 2Ko-MYC + 1Ko-IGH

ein 1Ko-MYC und 1Ko-IGH zusammen mit einem Signalsplit für *MYC* darstellen. Allerdings konnte eine Signalausdünnung zum jeweils anderen Signal dargestellt werden. In Abwesenheit einer reziproken Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  wurde der Befund als Normvariante gewertet (2Ko-MYC+1Ko-IGH)(Tabelle 4.5).

Das Präparat mit der Fallnummer 21 bot intestinales Gewebe mit einem Sekundärfollikel. Insgesamt konnten in diesem Präparat 1596 Zellen ausgewertet werden. Hiervon entfielen 200 Zellen auf das Epithel, weitere 100 Zellen auf das Stroma und die restlichen 1296 Zellen auf den Follikel. Die Zellen beinhalteten Signalkonstellationen aus 1 bis 2Ko-MYC. Zudem zeigte sich in einer Epithelzelle ein einzelnes proximales Signal von *MYC* und 1Ko-MYC. Darüber hinaus zeigte sich in einer weiteren Zelle des Stromas ein einzelnes

proximales Sondensignal des *MYC*-BAP-Assays mit einer Konstellation aus 1Ko-MYC- und 2Ko-IGH. In beiden Zellen war eine Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  abwesend. In vier Follikelzellen beobachteten wir einzelne *MYC*-Sondensignale für je den proximalen und distalen Anteil, die alle zusammen mit 1Ko-MYC auftraten. In einer Zelle trat ein *MYC*-Einzelsignal der distalen *MYC*-BAP-Sonde neben 2Ko-MYC auf, was einen Hinweis auf eine Duplikation dieses Genortes geben könnte. In zwei weiteren Zellen präsentierten sich zwei Einzelsignale des distalen Anteils des *MYC*-BAP-Assays zu 1Ko-MYC, was wie im vorigen Beispiel auf eine numerische Aberration hinweisen könnte. Zusammengefasst war eine die *MYC*- und *IGH*-Loci betreffende Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  nicht anzutreffen. Der Anteil der Einzelsignale lag unterhalb der Nachweisgrenze für diese Strukturveränderung. Damit wurde das Präparat als negativ gewertet (Tabelle 4.7).

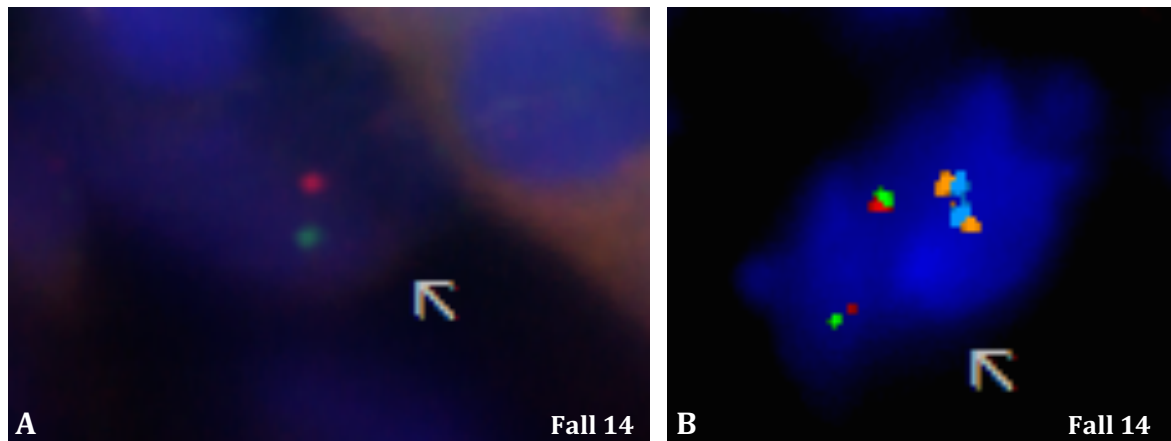
Im Präparat mit der Fallnummer 14 zeigte sich ein einzelner Follikel (Abbildung 4.9). Die Auswertung erfolgte nach drei Hybridisierungsversuchen. Es konnten 1700 Zellen ausgezählt werden, wovon 300 Zellen auf das Epithel, 300 Zellen auf das Stroma und 1100 Zellen auf das Follikel entfielen. In diesen Zellen stellten sich 1 bis 2-Ko-MYC dar. In einzelnen Zellen konnten bis zu 3-Ko-MYC beobachtet werden, was auf eine



**Abbildung 4.6: Fallnummer 14** HE-Färbung. FAE = Follikel-assoziiertes Epithel.

Polyploidie hinweisen könnte. Zusätzlich wurden in sechs Zellen Signalsplits für das *MYC*-BAP-Sondenassay beobachtet, wo Signalabstände drei Signaldurchmesser betrugen. Die Signale waren intensiv und klar abgrenzbar. In allen sechs Zellen traten keine *MYC*-Kokolokalisationen auf. Die Signale des *IGH*-Sonden-Assays konnten nicht eingestellt werden. Insgesamt überschritt der Anteil dieser Signalkonstellation die Nachweisgrenze von 3 auf 1000 Zellen. Die Abbildung 4.10 A zeigt die Aufnahmen einer Stromazelle, in der diese Signalkonstellation auftrat. Es fällt auf, dass die Zellkerngrenzen nicht scharf umrandet sind, wie es bei apoptotischen Zellen vorkommen kann. Somit könnte sich die Signalkonstellation an einer Zelle manifestiert haben, die der Apoptose unterlag und in der das Chromatin stark dekondensiert bis fragmentiert vorlag oder Teile des Genoms

verloren gegangen waren. Dies könnte eine Erklärung für die Abwesenheit der übrigen Sondensignale bieten (Tabelle 4.7).

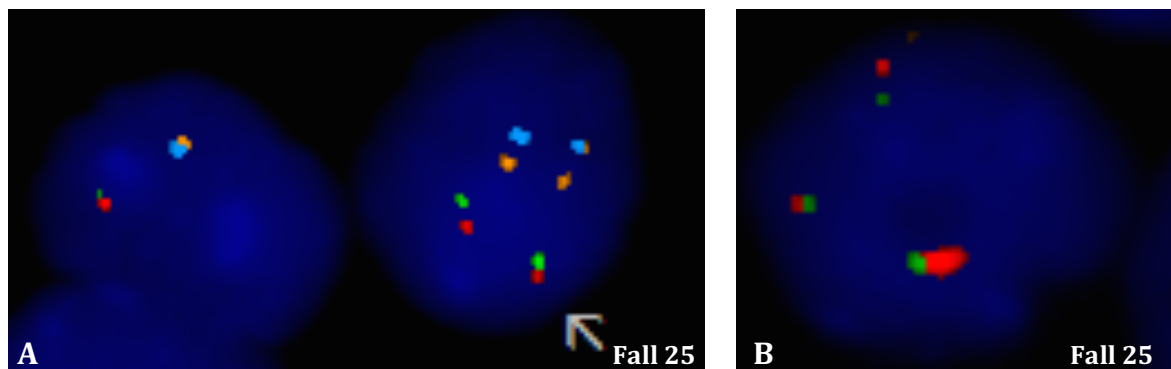


**Abbildung 4.7: Fallnummer 14.** **A** Signalabstand von drei Signaldurchmessern der *MYC*-BAP in der Abwesenheit weiterer Signale. Eine *t(8;14)/MYC-IGH* ist nicht nachweisbar. Die Zellkerngrenzen sind nicht abgrenzbar. **B** Falschfarbdarstellung einer Interphase-FISH: 2Ko-MYC + 2Ko-IGH.

Das Präparat mit der Fallnummer 4 enthielt einen Follikel. Es wurden insgesamt 1587 Zellen, darunter 100 Epithel-, 100 Stroma- und 1397 Follikelzellen, ausgewertet. Bei der Auswertung der Stromazellen beobachteten wir in einer Zelle ein einzelnes Signal der proximalen *MYC*-BAP-Sonde neben 1Ko-IGH. In einer weiteren Zelle kam 1Ko-MYC mit einem Einzelsignal der distalen *MYC*-BAP-Sonde und einem Einzelsignal der proximalen *IGH*-Sonde vor, die allerdings einen Signalabstand von mehr als zwei Signaldurchmessern zueinander boten. Somit konnte auch im Stroma kein Austausch von Gensequenzen zwischen den *MYC*- und *IGH*-Loci nachgewiesen werden. Unter den Follikelzellen wurden 38 Zellen mit Einzelsignalen beobachtet. Sie konnten mit oder ohne weitere Kolokalisationen auftreten. In einer Zelle trat hinsichtlich numerischer Besonderheiten ein Einzelsignal der distalen *MYC*-BAP-Sonde zu 2Ko-MYC auf. Die restlichen Sondenkonstellationen waren diesbezüglich unauffällig. Der Anteil der Einzelsignale an der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen überschritt im vorliegenden Fall die Nachweisgrenze für das Vorkommen von Einzelsignalen der *MYC*-flankierenden Sonden, die für die Zahl der ausgewerteten Zellen entsprechend bei 9-10 lag. Ein Grund hierfür könnte eine im Vergleich dünnere Schnittdicke als gewöhnlich sein, wodurch die Sondenpaare durch die Schnittebene voneinander getrennt wurden. Allerdings konnte auch in den Follikelzellen eine die *MYC*- und *IGH*-Loci betreffende Translokation nicht angetroffen werden. Das Präparat wurde als negativ eingestuft (Tabelle 4.7).



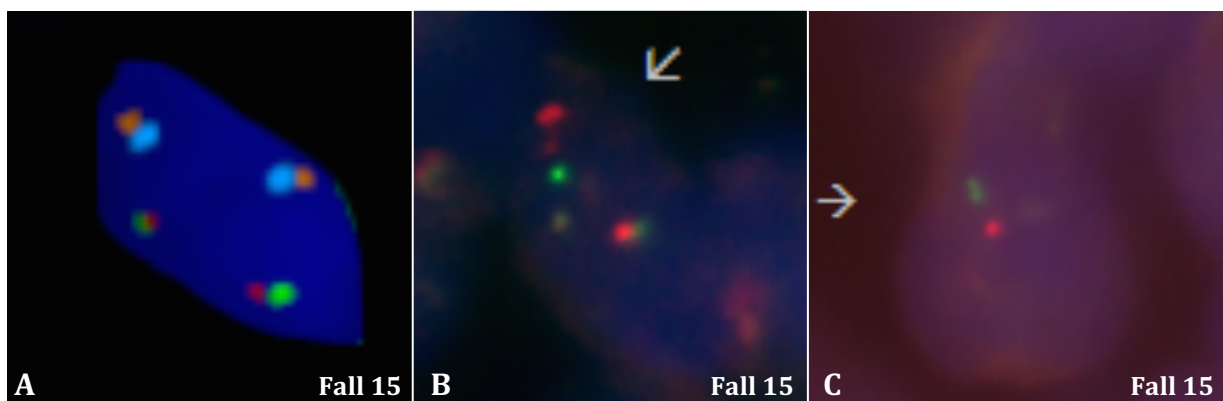
Im Präparat mit der Fallnummer 25 präsentierten sich mehrere floride Sekundärfollikel mit Keimzentren. In der Summe wurden 2100 Zellen ausgewertet, die sich aus 300 Epithel-, 300 Stroma- und schließlich 1500 Follikelzellen zusammensetzten. Die Epithel- und Stromazellen zeigten klare 2Ko-MYC. Die Follikelzellen zeigten in der Mehrheit ebenfalls klare 2Ko-MYC. Die Abbildung 4.11 zeigt beispielhaft die Signalkonstellation, wie sie in intakten, diploiden Zellen zu erwarten wäre (Abbildung 4.11 A). In einer Follikelzelle ließen sich 5 Einzelsignale beobachten, darunter zwei proximale *MYC*-BAP-Sondensignale, ein distales *MYC*-BAP-Sondensignal und zwei distale *IGH*-Sondensignale. Keines der Signale schien in enger Nachbarschaft zu einem anderen Signal angeordnet zu sein. Eine Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  konnte ausgeschlossen werden. In einer weiteren Follikelzelle ließen sich 3Ko-MYC darstellen. Weitere Signalmuster fehlten. Die Signalkonstellation könnte auf eine Duplikation des Chromosoms 8 oder eine Triploidie mit einem dreifachen Chromosomensatz hindeuten (Abbildung 4.11 B). In Abwesenheit der Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  wurde das Präparat als negativ gewertet.



**Abbildung 4.8: Fallnummer 25.** A Falschfarbdarstellung einer Interphase-FISH (2Ko-MYC+2Ko-IGH). B 3Ko-MYC als möglicher Hinweis für Duplikation des Chromosoms 8 oder Triploidie.

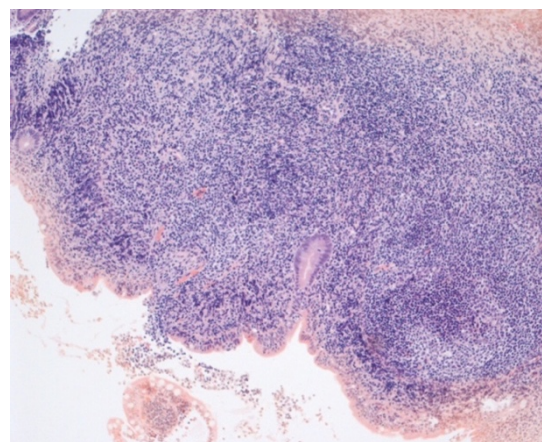
Das Präparat mit der Fallnummer 15 beinhaltete zwei Follikel mit Keimzentramsreaktionen. Insgesamt ließen sich 1899 Zellen auswerten, die sich aus 100 Epithel-, 199 Stroma- und 1600 Follikelzellen zusammensetzten. In der Mehrheit ließen sich 1 bis 2Ko-MYC darstellen (Abbildung 4.12 A). Es zeigten sich vereinzelt Einzelsignale der *MYC*-BAP. Da das Präparat teilweise Areale mit einer kritisch zu hohen Zelldichte aufwies, schlossen wir eine weitere Hybridisierung an. Auch nach der wiederholten Hybridisierung blieb die Zelldichte in bestimmten Hybridisierungsarealen hoch. Auch hier bestätigte sich das Vorkommen eines Signalsplits der *MYC*-BAP, welcher auf einen *MYC*-Bruch hindeutete. In einer Zelle war ein Einzelsignal der distalen *MYC*-BAP-Sonde mit jeweils 1Ko-MYC und 1Ko-IGH nachweisbar. Es konnte kein Austausch von Gensequenzen zwischen dem *MYC*- und *IGH*-Locus nachgewiesen werden. In zwei

weiteren Zellen ließen sich Signalsplits der *MYC*-BAP darstellen, dessen Abstände mehr als zwei Signaldurchmesser betrug (Abbildung 4.12 B und C). In beiden Fällen erfolgte kein Nachweis der Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$ . Es zeigte sich in einer weiteren Zelle eine Signalkonstellation bestehend aus jeweils 2Ko-MYC- und 2Ko-IGH. Außerdem ließen sich zwei Einzelsignale für je die distale und proximale *MYC*-BAP-Sonde darstellen, deren Abstände drei Signaldurchmesser überschritt. Eine Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Schließlich beobachteten wir in einer weiteren Zelle ein Vorkommen von 5 Ko-IGH. Eine Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  war nicht darstellbar. Letztgenannte Signalkonstellationen könnten einen Hinweis auf Duplikationen der betroffenen Genabschnitte geben. In der Gesamtbetrachtung stuften wir das Vorkommen der *MYC*-Bruch implizierenden Ereignisse unterhalb der Nachweisgrenze ein und werteten das Präparat als negativ (Tabelle 4.8).



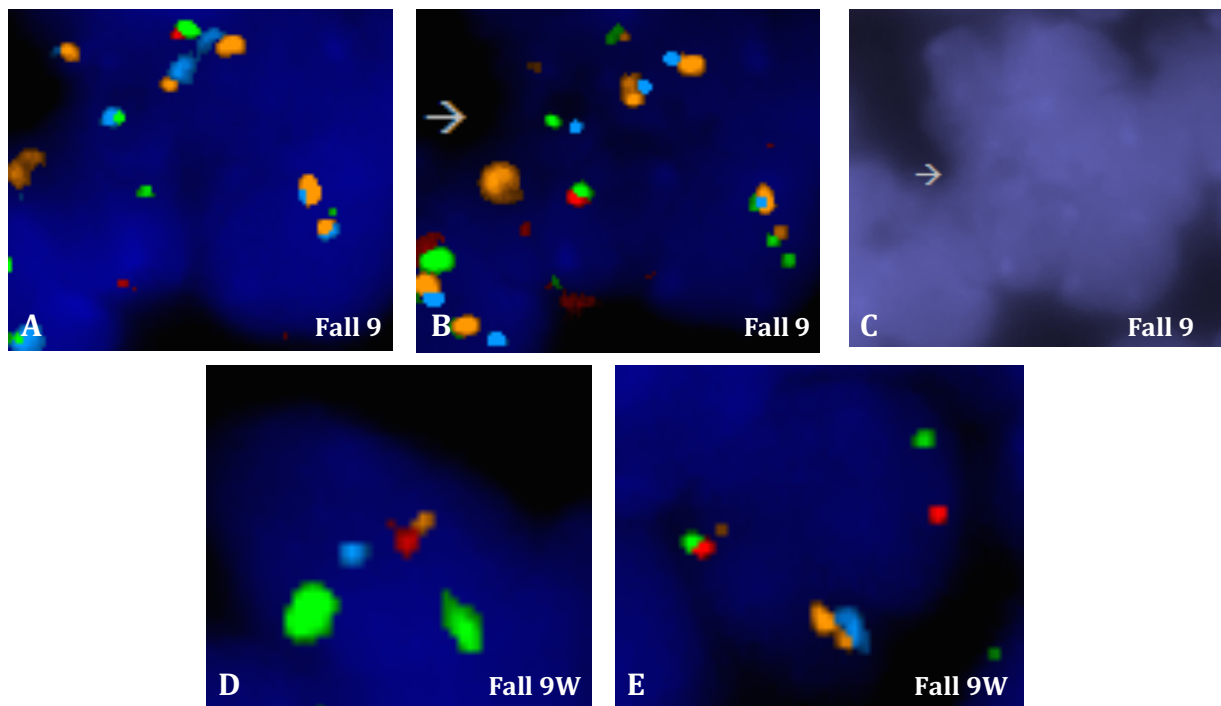
**Abbildung 4.9: Fallnummer 15.** A FISH-Falschfarbdarstellung (2Ko-MYC+2Ko-IGH). B und C Signalsplit der *MYC*-BAP versus Normvariante bei weitem Signalabstand. Kein Nachweis einer  $t(8;14)/MYC-IGH$  darstellbar.

Das Präparat mit der Fallnummer 9 enthielt große Keimfollikelagglomerate. In der Summe wurden 2099 Zellen ausgewertet, die sich aus 300 Epithelzellen, 300 Stromazellen und 1499 Follikelzellen zusammensetzten (Abbildung 4.13). Die Hybridiserungsqualität reichte von Arealen mit intensiven Fluoreszenzsignalen und geringem Hintergrundrauschen zu Arealen mit hohem Hintergrundrauschen, Gewebsbrücken sowie Ausleuchten des roten Fluoreszenzsignals.



**Abbildung 4.10: Fallnummer 9.** HE-Färbung.

Dies würde das Vorkommen von Einzelsignalen der distalen MYC-BAP-Sonde ohne den Nachweis einer Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  erklären. An einer Stelle ließ sich eine *MYC-IGH* Fusion darstellen. Diese war umgeben von regelhaften Signalkonstellationen aus 2Ko-MYC und 2Ko-IGH. Die Signale stammten von verschiedenen Zellkernen, ohne dass morphologisch Zellgrenzen abgrenzbar waren. Hierbei hätte es sich um die Projektion von zwei Sondensignalen übereinander liegender Zellkerne oder um eine echte Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  handeln können. Eine Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  konnte somit nicht sicher ausgeschlossen werden (Abbildung 4.14 A-C). Aus diesem Grund wurde eine weitere Hybridisierung des Falls durchgeführt. Hier stellten sich mehrfach Einzelsignale des *MYC-BAP*-Sonden ohne den Nachweis einer Translokation dar (Abbildung 4.14 E). In einer Zelle ließen sich 1Ko-MYC sowie Einzelsignale für je die proximalen und distalen *IGH*-Sonden in einem Abstand von drei Signaldurchmessern darstellen. Da der Abstand nicht zwei oder weniger Signaldurchmesser betrug und in der Zellumgebung vermehrt Hybridisierungsartefakte in Form grüner Fluoreszenzpartikel vorlagen, werteten wir die Konstellation als negativ (Abbildung 4.14 D; Tabelle 4.7).



**Abbildung 4.11: Fallnummer 9: A, B, D, E FISH-Falschfarbendarstellung; C DAPI-Darstellung. A und B.** 1Fus-MYC/IGH (s. Pfeil). C: Zellkerngrenzen sind in der DAPI-Darstellung kaum abgrenzbar, sodass die Hybridisierung wiederholt wurde. **Fall 9W (Wiederholung): D** Fus-MYC/IGH scheint aufgrund eines Signalabstandes von  $>2$  Signaldurchmessern unwahrscheinlich. **E** Signalsplit der *MYC-BAP*-Sonden: Sondenkonstellation entsprechend 1Ko-MYC+1Ko-IGH+1MYC-prox+1MYC-dist. prox: proximal; dist: distal

Die Ergebnisse des Screenings nach der Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  in Gewebeproben aus der Ileozökalregion von Patienten ohne Lymphom zusammenfassend,

konnte in keinem der 17 auswertbaren Fälle eine Translokation beobachtet werden. Lediglich ein Fall enthielt ein fragliches Translokationsereignis, welches bei einer erneuten Hybridisierung nicht bestätigt werden konnte. Somit scheinen prä-maligne B-Zellen mit  $t(8;14)/MYC-IGH$  in den Peyer Plaques der Ileozökalregion gesunder Kinder und junger Erwachsener nicht vorhanden zu sein.

## 5 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war, das Vorhandensein prä-maligner Zellen in kindlichen, nicht-neoplastischen Gewebeproben aus den Peyer Plaques der Ileozökalregion zu untersuchen. Die  $t(8;14)/MYC-IGH$  ist pathognomonisch für das BL, der häufigsten Lymphomerkkrankung bei Kindern. Es sollte untersucht werden, ob die  $t(8;14)/MYC-IGH$  im Zuge der physiologischen B-Zell-Reifung bei nicht-neoplastischen Gewebeproben vorkommt. Dazu wurden FFPE-Schnitte mittels FISH mit einem Vier-Farb-FISH-Assay nach der häufigsten *MYC*-Translokation, der  $t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH$ -Fusion, gescreent.

Nachfolgend werden die Ergebnisse unter Berücksichtigung methodischer Aspekte des angewandten Verfahrens sowie ihre biologische Bedeutung unter Einbeziehung aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse diskutiert.

### 5.1 Methodische Aspekte

Zum Screening der Translokation des *MYC*-Gens in die Nähe des transkriptionsaktiven *IGH*-Locus in B-Zellen der Peyer Plaques wurde ein hochsensitives diagnostisches Vier-Farb-FISH-Assay etabliert. Es wurden FFPE-Schnitte von 25 aus der Ileozökalregion gewonnenen Gewebeproben mittels FISH gescreent. Das Vier-Farb-FISH-Assay konnte erfolgreich an den Gewebeproben angewandt werden. Unter histopathologischen Gesichtspunkten stellen FFPE-Schnitte eine methodische Herausforderung dar, da die Zelldichte, insbesondere in den hochproliferativen Keimfollikeln, bedingt, dass sich die Zellkerne nicht immer klar demarkieren (Ventura et al., 2006).

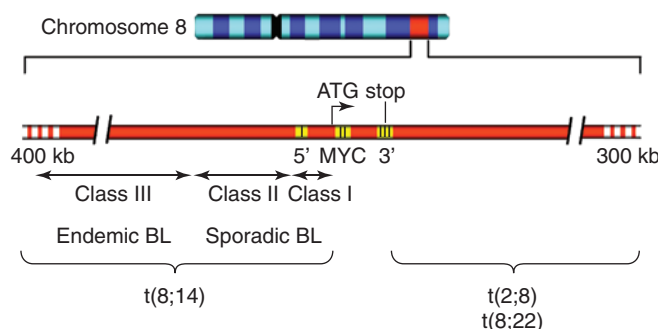
In den negativen Kontrollproben wurde keine Zelle mit der  $t(8;14)/MYC-IGH$  identifiziert. Die Validität des Vier-Farb-FISH-Assays wurde an BL-Zelllinien getestet und erwartungsgemäß zeigten diese ein positives Ergebnis. Da es sich bei den Gewebeproben der Screeningkohorte um FFPE-Schnitte handelte, wurden zusätzliche Kontrollen an FFPE-Geweben durchgeführt, sowohl an negativen als auch an positiven Gewebeproben, in denen die Translokation bereits nachgewiesen worden war.

Von den 25 eingesetzten Geweben der Screeningkohorte konnten 17 Proben erfolgreich ausgewertet werden. Insgesamt wurden bis zu 3 Hybridisierungsversuche durchgeführt.

Wurde in allen Versuchen kein Hybridisierungssignal erhalten, wurden die Proben von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Insgesamt konnten in der Untersuchung die Durchführbarkeit, Sensitivität sowie die Validität des Vier-Farb-FISH-Assays erfolgreich nachgewiesen werden. Ein positives Ergebnis definierte sich durch das gemeinsame Auftreten eines Bruch- und Fusionsereignisses. Der Vorteil dieser zwei Kriterien lag darin, dass die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse verringert werden konnte. Dies birgt allerdings die Gefahr einer niedrigeren Sensitivität des Assays aufgrund einer hohen Zahl falsch-negativer Ergebnisse (Siebert et al., 1998). Dies ist vor dem Hintergrund, dass nicht-neoplastisches Gewebe untersucht wurde und nur geringe Mengen an Tumorzellen zu erwarten waren, von besonderer Relevanz (Ventura et al., 2006). Um dieses Hindernis zu umgehen wurde in der Studie versucht, mindestens 1000 Zellen pro Fall auszuwerten, obwohl die Richtlinien der Diagnostik für die Routinediagnostik die Auswertung von nur 100 Zellen pro Fall erfordern.

Die diagnostische Empfindlichkeit anderer Verfahren wie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist der FISH überlegen. Während die Sensitivität der PCR  $10^{-5}$  beträgt, liegt sie bei der FISH bei  $10^{-3}$ . Mittels PCR können Millionen von Zellen innerhalb kurzer Zeit untersucht werden. Der Vorteil der FISH im Gegensatz zur PCR liegt allerdings darin, dass die diagnostische Sicherheit der FISH von der Streuung der Bruchpunktlokalisationen, in der vorliegenden Arbeit des *MYC*-Gens und des *IGH*-Locus, unberührt bleibt. Die Bruchpunkte des beteiligten Translokationspartners *MYC* können nämlich weit gestreut sein. Das *MYC*-Gen besteht aus drei Exonen. Exon 1 ist nichtkodierend und enthält zwei Promotorregionen. Die Exone 2 und 3 sind kodierend, wobei die Transkription an der Stelle 16 des Exon 2 beginnt (Boxer, 2001). Je nach Bruchpunktlokalisation werden 3 Klassen unterschieden: innerhalb des *MYC*-Gens (*class I*), unmittelbar stromaufwärts des *MYC*-Gens (*class II*) oder distante Bruchpunktlokalisationen (*class III*) (s. Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des *MYC*-Locus des Chromosoms 8q24.** In gelb sind die 3 Exone des *MYC*-Gens markiert. Die Bruchpunktlokalisationen sind nach ihren Klassen benannt und den BL-Entitäten zugeordnet (nach Gascoyne et al., 2011).

Bei den sporadischen und HIV-assoziierten Formen erfolgt der Bruch im *MYC*-Gen innerhalb von Exon 1 beziehungsweise Intron 1 (*class I*), kann aber auch unmittelbar stromaufwärts innerhalb der 5'-Region des *MYC*-Gens stattfinden (*class II*) (Boxer, 2001). Die Bruchpunkte sind dabei zwischen 55 und mehr als 340 Kb 3' beziehungsweise stromaufwärts lokalisiert (S. Joos et al., 1992 a,b; Zeidler et al., 1994). Dies bedeutet, dass bei Bruchpunktregionen innerhalb des Intron 1 wie bei den *class I*-Bruchpunktmustern das Exon 1 des *MYC*-Gens nicht nachgewiesen werden kann. Dies schränkt die Auswahl passender Primer für PCR-Verfahren stark ein, insbesondere aber die Anwendung eines PCR-Verfahrens zur Detektion von sBL und somit die Anwendung in Ländern mit gehäuftem Vorkommen des sBL. Beim eBL erfolgt der Bruch auf Chromosom 8 in der Regel mehrere Kb in 5'-Richtung des *MYC*-Gens (*class III*) und das *MYC*-Gen bleibt intakt.

Auch die Bruchpunktregionen für den *IGH*-Locus können unterschiedlich lokalisiert sein (Joos et al., 1992; Chong et al., 2018). Die zahlreichen unterschiedlichen Möglichkeiten der Rekombination von V(D)J-Gensegmenten, Switch-Gensegmenten und anderen bei der somatischen Hypermutation verursachten Bruchpunkten erfordern ein technisch sehr aufwendiges PCR-Verfahren mit einer hohen Zahl unterschiedlicher Primer. Auf die V(D)J-Rekombination und ihre Bedeutung für die vorliegende Arbeit soll in Kapitel 5.2.4 näher eingegangen werden.

Ein zusätzlicher Vorteil der FISH im Gegensatz zur PCR besteht darin, dass beim PCR-Verfahren hypermutierte Bereiche, die im Zuge der somatischen Hypermutation entstehen, das Annealing der Primer behindern könnten. In der Gesamtbetrachtung der oben genannten Punkte ist die in dieser Arbeit gewählte Methode der Goldstandard zur Detektion der t(8;14)/*MYC-IGH*.

## 5.2 Biologische Bedeutung des Screeningergebnisses und ihr Beitrag zum Verständnis der Lymphom-Pathogenese des sBL

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war, zu analysieren, ob *MYC*-Translokationen in Peyer Plaques als Resultat eines illegitimen Rearrangements im *IGH*-Locus während der B-Zell-Reifung entstehen. Hierzu konnten mittels FISH Gewebeproben von 17 Patienten ohne Lymphom auf diese Veränderungen ausgewertet werden. Es konnte in keinem der 17 Fälle eine positive Zelle für die Translokation t(8;14)/*MYC-IGH* beobachtet werden. Prä-maligne B-Zellen mit *MYC*-Translokation in den Peyer Plaques der Ileozökalregion

scheinen somit nicht in einem erfassbaren diagnostischen Zeitfenster nachweisbar zu sein. Im Folgenden sollen dieses Ergebnis und die Bedeutung von chromosomalen Aberrationen bei gesunden Individuen mit Fokus auf lymphatische Neoplasien diskutiert werden.

### **5.2.1 Die t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH-Fusion in gesunden und immunkompromitierten Individuen**

In der Literatur findet sich lediglich eine weitere Untersuchung, die gesunde Individuen nach dem Vorhandensein prämaligner t(8;14)/MYC-IGH-positiver Zellen untersuchte. In einer Kohorte von 99 HIV-negativen sowie 114 HIV-positiven Männern wurde über einen Zeitraum von 12 Jahren das Vorkommen der t(8;14)/MYC-IGH im pB mittels nested PCR-Verfahren analysiert (Müller et al., 1995). Bei 10,5% der HIV-positiven Männer und 2% der nicht-infizierten Männer konnten Zellen mit der t(8;14)/MYC-IGH identifiziert werden. Letztere wiesen die Translokation zu einem einzelnen Zeitpunkt und nicht mehr in den Folgeuntersuchungen auf.

Zwölf der HIV-positiven Männer entwickelten zum späteren Zeitpunkt ein NHL, allerdings handelte es sich in keinem der Fälle um ein BL. In drei Fällen konnte auch das primärinfiltrierte Gewebe mittels PCR analysiert werden. Alle drei NHL waren t(8;14)/MYC-IGH-negativ. Darüber hinaus konnte eines der drei Fälle retrospektiv nach der Präsenz der t(8;14)/MYC-IGH vor der Lymphomdiagnoseerstellung untersucht werden. In dieser Analyse konnten Zellen mit einer t(8;14)/MYC-IGH identifiziert werden, hingegen war das NHL t(8;14)/MYC-IGH-negativ. Somit gelang den Autoren zu zeigen, dass das Vorhandensein t(8;14)/MYC-IGH-positiver Lymphozyten nicht unweigerlich mit der Genese eines BL in Zusammenhang gebracht werden muss (Müller et al., 1995).

Im Gegensatz zur Arbeit von Müller und Kollaboratoren fand sich in unseren durchgeführten Analysen kein Anhalt auf Zellen mit der t(8;14)/MYC-IGH. Diese Diskrepanz könnte in der Sensitivität der FISH-Technik gegenüber der hier angewandten PCR liegen, wie im vorherigen Kapitel diskutiert wurde. Auch unterscheidet sich das untersuchte Probenmaterial in dieser Studie: Während für die Detektion der t(8;14)/MYC-IGH beim Gesunden und HIV-infizierten Spender pB untersucht wurde, wurden in unseren Untersuchungen Biopsate untersucht. Dies könnte einen Einfluss auf die Nachweisgrenze haben, denn in den Biopsaten wurden circa 1000 Zellen in situ untersucht. Wenn man pB mittels PCR untersucht, kann man hingegen auf vergleichbar einfache Weise Millionen von Zellen auf einmal analysieren. Die Untersuchung am



Gewebe selbst bietet allerdings den Vorteil, translokationspositive Zellen funktionellen Kompartimenten direkt zuzuordnen und somit einen besseren Einblick in die Entstehung von Lymphomen gewinnen zu können.

### 5.2.2 Die t(14;18)(q32;q21)/*IGH-BCL2*-Fusion in gesunden Individuen

Für andere chromosomale Aberrationen bei Lymphomen, wie die für die FL charakteristische t(14;18)/*IGH-BCL2*, war bereits bekannt, dass mehr als die Hälfte der gesunden Individuen diese Veränderung tragen. Historisch betrachtet konnten Limpens und Kollaboratoren als erste in Gesunden die t(14;18)/*IGH-BCL2* in Lymphknoten und Tonsillen mit follikulärer Hyperplasie nachweisen, die Prävalenz translokationspositiver Zellen betrug bis zu 54% (Limpens et al., 1991) (s. Kapitel 1.3.1.1). Diese Beobachtungen konnten in weiteren Arbeiten an pB bestätigt werden, worin sich Prävalenzen t(14;18)/*IGH-BCL2*-positiver Fälle von 23% bis zu 46% zeigten (Summers et al., 2001; Schmitt et al., 2006; Schüler et al., 2009; Hirt et al., 2013).

In der Studie von Schüler und Kollaboratoren wurden Proben von 84 Kindern eingeschlossen, darunter 36 Nabelschnurblutproben. Bis zum Alter von 10 Jahren konnten keine t(14;18)/*IGH-BCL2*-positiven Fälle nachgewiesen werden. In der Altersgruppe von 10 bis 19 Jahren waren t(14;18)/*IGH-BCL2*-positive Fälle allerdings bereits mit einer Prävalenz von 19% nachweisbar (Schüler et al., 2009).

Die Beobachtung dieser Alterskorrelation deckt sich auch mit dem Vorkommen des FL bei vornehmlich älteren Patienten. Entgegen der Annahme, bei den t(14;18)/*IGH-BCL2*-positiven Zellen würde es sich um zirkulierende naive B-Zellen handeln, konnte gezeigt werden, dass diese Zellen einen Klassenwechsel durchlaufen waren und das Oberflächenprotein CD27 als Zeichen einer durchgemachten Keimzentrumsreaktion aufwiesen. Daher wird angenommen, dass die t(14;18)/*IGH-BCL2*-positiven Zellen beim Gesunden zunächst in lymphatischen Geweben lokalisiert sind, durch das dortige Mikromilieu zur Proliferation angeregt werden, klonal persistieren und schließlich im pB zirkulieren, wo sie mit zunehmendem Alter nachgewiesen werden können (Roulland et al., 2006).

Die Arbeiten veranschaulichen eindrücklich, dass Fehler in der Umlagerung der *IG*-Gene mit steigendem Alter akkumulieren. Möglicherweise trifft dies auch für die t(8;14)/*MYC-IGH* zu und könnte bedeuten, dass das Alter der für diese Arbeit gewählten Kohorte zu jung gewählt ist und in älteren Generationen mit höherer Wahrscheinlichkeit positive

Ergebnisse zu erwarten wären. Auch fehlt im jungen Alter der Kontakt zu Umweltfaktoren, die zu chromosomalen Instabilitäten führen könnten und somit das Ausbleiben t(8;14)/*MYC-IGH*-positiver Zellen in unserer Arbeit erklären könnten.

In diesem Kontext soll erwähnt werden, dass auch eine pädiatrische Variante des FL existiert, die allerdings nicht die für das FL typischen Translokationspartner enthält und eine diagnostische Herausforderung darstellt. Gehäuft wurden hier chromosomale Brüche im *IGH*, *BCL6*-Locus sowie die t(6;14)(p25;q32)/*IRF4-IGH* nachgewiesen (Oschlies et al., 2010; Liu et al., 2013). Die Inzidenz einer sporadischen Translokation t(6;14)(p25;q32)/*IRF4-IGH* in erwachsenen oder kindlichen gesunden Individuen in pB oder Geweben wurde unseres Wissens nach bisher nicht untersucht. Eine solche Untersuchung wäre in der Zukunft interessant, da beide Lymphome im Kindesalter entstehen. Da in den oben genannten Arbeiten im pB insbesondere erst ab einem Alter von 10 Jahren translokationspositive Zellen nachweisbar waren, würde sich hier eine Untersuchung am Gewebe wie in der hier vorliegenden Arbeit eher eignen. Im folgenden Kapitel wird die Inzidenz rekurrenter genetischer Veränderungen beim Gesunden im Kindesalter diskutiert.

### **5.2.3 Die t(9;22)(q34;q22)/*ABL-BCR*-Fusion und *MLL*-Translokationen in pädiatrischen gesunden Individuen**

Eine Reihe von Untersuchungen konnte das Vorkommen des *BCR-ABL*-Fusionstranskripts als Resultat der Translokation t(9;22) in gesunden Individuen zeigen (s. Kapitel 1.3.1.1). Song und Kollaboratoren untersuchten gesunde Individuen und Zellen aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener auf häufige Leukämie- und Lymphomassoziierte genetische Aberrationen. Die *BCR-ABL* p190 und p210 Fusionstranskripte wurden mittels nested RT-PCR jeweils getrennt untersucht, 42% der auf das *BCR-ABL* p210 Fusionstranskript Untersuchten zeigten positive Ergebnisse. Das Vorkommen zeigte eine Altersabhängigkeit, die mit 20% in der Neugeborenenperiode über 50% in der Altersgruppe von 26 bis 40 Jahre bis hin zu 90% bei Erwachsenen über 50 Jahre zunahm. Die Prävalenz in den Proben aus dem Nabelschnurblut zeigten vergleichbare Ergebnisse wie für die Neugeborenenperiode. Für das *BCR-ABL* p190 Fusionstranskript konnte keine Altersabhängigkeit beobachtet werden (Song et al., 2011).

Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten des *BCR-ABL* p210 Fusionstranskripts mit höherem Alter ist insofern nicht überraschend. Auch die Inzidenz der CML steigt mit dem

Alter. Die *BCR-ABL* p190 Fusionstranskript-positive ALL tritt hingegen vermehrt bei Kindern auf, worin die fehlende Altersabhängigkeit begründet liegen könnte.

Neben dem Fusionstranskript *BCR-ABL* wurden unter anderem auch das Transkriptionsprodukt der aus dem Rearrangement des auf dem Chromosom 11q23 lokalisierten *Mixed Lineage Leukemia*-Gens (*MLL*) untersucht. Dieses Gen ist an der Regulation der Transkription unter anderem der *HOX*-Gene beteiligt. Der Mechanismus des Rearrangements beinhaltet chromosomale Translokationen mit verschiedenen Translokationspartnern, partielle Genduplikationen und Amplifikationen und ihr Auftreten ist mit der akuten myeloischen Leukämie (AML) sowie der ALL, mit einem Anteil von 50 Prozent der AML beim Säugling, assoziiert (Nakamura et al., 2002; Nilson et al., 1996). Aus partiellen Genduplikationen hervorgehende *MLL* Transkripte konnten in 67% der Probanden nachgewiesen werden. Das Vorkommen betrug in der neonatalen Periode 79% und hielt in der frühen Kindheit mit bis zu 70% an (Song et al., 2011).

Die oben genannten Untersuchungen zusammenfassend konnten passend zu der Inzidenz der verschiedenen Entitäten Alterskorrelationen für die *IG*-assoziierte *t(14;18)/IGH-BCL2* sowie das *BCR-ABL* p210 Fusionstranskript beobachtet werden, was die Plausibilität der Untersuchungsergebnisse unterstreicht. Allerdings wiesen einige der Untersuchungen nach, dass chromosomale Aberrationen bereits früh in der Kindheit auftreten können, teilweise schon im Nabelschnurblut von Neugeborenen. Diese Beobachtungen weichen von unseren ab. Ein Grund, weshalb in dem von uns analysierten Kollektiv keine *t(8;14)/MYC-IGH*-positiven Zellen nachgewiesen wurden, könnten die unterschiedlichen pathomolekularen Mechanismen der Entstehung dieser Translokationen sein. Bei der *t(9;22)* und den *MLL*-Rearrangements handelt es sich um Aberrationen, die zu einem Fusionstranskript auf molekularer Ebene führen und anders als die *IG*-assoziierten Translokationen für ein Fusionsprotein kodieren. Die Entstehung dieser Translokationen beruht nicht auf illegitimer V(D)J-Rekombination, somatischer Hypermutation oder Klassenswitch-Rekombination wie bei den *IG*-assoziierten Translokationen *t(8;14)/MYC-IGH* und *t(14;18)/IGH-BCL2*.

Nicht zuletzt handelt es sich bei der *BCR-ABL*-positiven ALL oder der AML mit Rearrangement des auf dem Chromosom 11q23 lokalisierten *MLL* des Kindesalters um unreife lymphatische beziehungsweise myeloische Blasten. Sie sind charakterisiert durch die unkontrollierte Proliferation früher Vorläuferzellen im Knochenmark, die Ausreifung der Zellen ist auf einer frühen Differenzierungsebene arretiert. Möglicherweise bestehen

bei der Entwicklung kindlicher Lymphome zelluläre Selektionsmechanismen im Zuge der B-Zellreifung, sodass aberrante Zellen frühzeitig erkannt und eliminiert werden.

Ein weiterer Grund für das Fehlen  $t(8;14)/MYC-IGH$ -positiver Zellen in der eigenen Arbeit wurde bereits weiter oben diskutiert und könnte in den im Kapitel 5.1 erwähnten methodischen Einschränkungen liegen. In den oben aufgeführten Arbeiten wurden als Untersuchungsmethode PCR-Verfahren angewandt. Die PCR kann im Fall der  $t(14;18)/IGH-BCL2$  problemlos angewandt werden, da die Bruchpunkte beim *IGH*-Locus im Rahmen einer illegitimen V(D)J-Rekombination entstanden und in der Mehrheit der Fälle in den  $J_H$ -Gensegmenten lokalisiert sind. Im Bereich des *BCL2*-Gens sind die Bruchpunkte in definierten Bereichen geklustert (Tsujimoto et al., 1984; Yin and Luthra, 2013). Daher ist das Design eines PCR-Verfahrens leichter als beim BL. In den Philadelphia-Chromosom-positiven CML sind die Bruchpunktlokalisationen ebenfalls in einem begrenzten Bereich von 5,8 Kb geklustert (Groffen et al., 1984). Demgegenüber sind die Bruchpunktlokalisationen der Philadelphia-Chromosom-positiven ALL über einen weitaus breiteren Bereich von 35 Kb gestreut (Heisterkamp et al., 1988). Allerdings wurden diese Translokationen mittels Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) nachgewiesen, das heisst die DNA wurde ausgehend vom Fusionstranskript repliziert. Auf diese Weise konnte die Streuung der Bruchpunktregionen vernachlässigt werden (Song et al., 2011). Einschränkend ist der Nachweis eines Fusionstranskripts nicht der sichere Beweis für das Vorliegen einer chromosomalen Translokation, denn auch Artefakte können ein positives Ergebnis generieren, ohne dass Translokationen vorliegen. In Arbeiten von Caldas und Kollaboratoren konnten beispielsweise mittels RT-PCR partielle Genduplikationen nachgewiesen werden, ohne dass diese genomisch vorlagen (Caldas et al., 1998).

### **5.2.4 Biologische Bedeutung chromosomaler Aberrationen in gesunden Individuen**

Insgesamt bleibt die biologische Bedeutung des Vorkommens derartiger chromosomaler Aberrationen bei Gesunden bislang nicht geklärt. Die Anzahl  $t(8;14)/MYC-IGH$ -positiver Gesunder scheint um ein Vielfaches höher zu sein als die Inzidenz der Erkrankungen (Müller et al., 1995). Ein Grund hierfür könnte das Vorkommen der  $t(8;14)/MYC-IGH$  in terminal differenzierten Zellen sein, die anders als hämatopoetische Stammzellen oder frühen Progenitorzellen kein Potential zur Entwicklung maligner Klone besitzen. Sie

würden durch den natürlichen Zelltod eliminiert werden (Biernaux et al., 1995). Demgegenüber zeigt sich beim FL ein illegitimes V(D)J-Rearrangement, welches typischerweise in den Progenitorzellen entsteht und mit dieser Theorie nicht vereinbar wäre (s. Kapitel 5.2.2).

Gleichzeitig geht aus den oben genannten Arbeiten hervor, dass die alleinige Translokation nicht für die maligne Transformation der hämatopoetischen Zellen ausreicht. Mausmodelle beim FL ebenso wie bei der CML zeigten, dass follikuläre Hyperplasien respektive CML-ähnliche Formen nach einer gewissen Latenz erst entstanden (Daley et al., 1990; Vaux et al., 1988). Die Inokulation von Translokationen in die Zellen der Mäuse würde nicht alleine für eine maligne Transformation ausreichen, erst durch die Akkumulation zusätzlicher Mutationen könnte es zur klonalen Expansion kommen (Bäsecke et al., 2002). Im Kapitel 5.2.6 soll auf diesen Aspekt näher eingegangen werden. Interessanterweise zeigt sich die Latenz bis zur Malignität bei Überexpression des MYC-Proteins kürzer, sodass in der oben genannten Hypothese die intrinsischen Eigenschaften der Protoonkogene Berücksichtigung finden müssen.

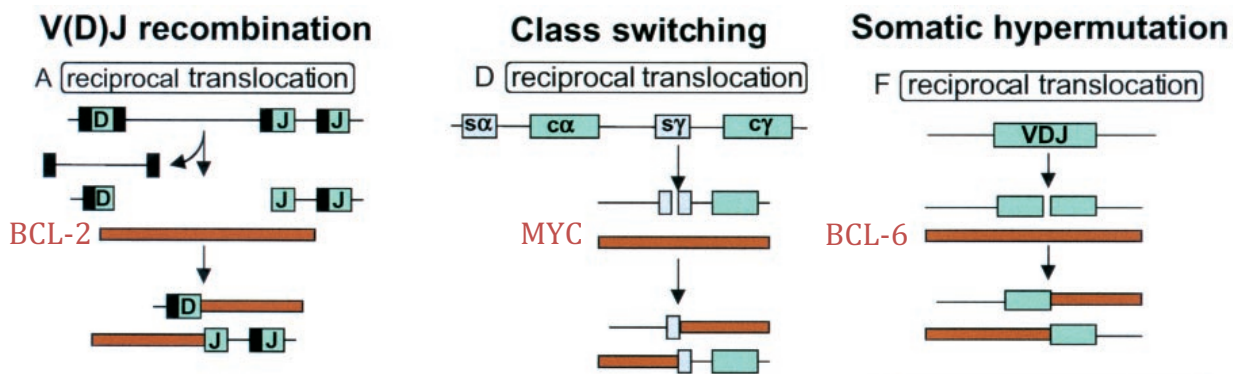
### **5.3 Interpretation des Ergebnisses unter Berücksichtigung des zeitlich-örtlichen Zusammenhangs zwischen Translokation und Krankheitsmanifestation**

Für das Verständnis der Krankheitsmanifestation der Lymphomentitäten müssen die Abläufe der B-Zellreifung nicht alleine zeitlich, sondern im Zusammenhang mit den einzelnen Kompartimenten der B-Zellreifung betrachtet werden. Hieraus ergibt sich eine weitere Erklärung, weshalb in unserer Arbeit t(8;14)/MYC-IGH-positive Zellen möglicherweise nicht nachgewiesen werden konnten.

Denn die Zeitpunkte des Translokationsereignisses und die Zeit bis zur malignen Transformation bei Überexpression des jeweiligen Protoonkogens unterscheiden sich maßgeblich.

In Kapitel 5.1 wurde bereits auf die Bruchpunktregionen im MYC-Gen eingegangen. Auch die Bruchpunkte des beteiligten IG-Translokationspartners können unter den verschiedenen BL-Entitäten unterschiedlich lokalisiert sein. Beim eBL erfolgt der Bruch auf Chromosom 14 in der Regel in 5'-Richtung oder innerhalb des J<sub>H</sub>-Gensegments und deutet auf ein illegitimes V(D)J-Rearrangement hin, ähnlich wie beim FL. Bei den

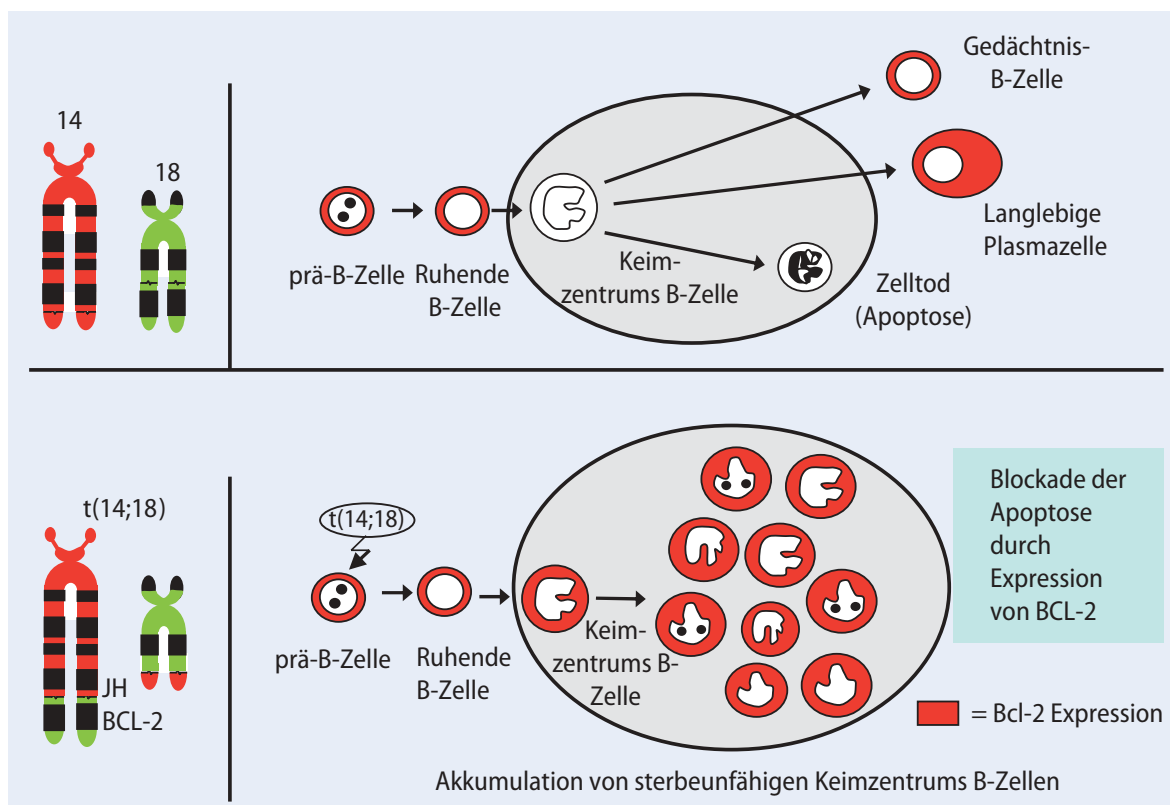
sporadischen und HIV-assoziierten Formen suggeriert der Bruch in den  $C_H$ -Gensegmenten der *IGH*  $S\mu$  switch-Region (3' der Intron- $E\mu$ ), dass das Translokationsereignis an den für Klassenwechsel typischen Regionen und so in der Folge eines fehlerhaften AID-vermittelten Klassenwechsels während der Keimzentrumsreaktion stattfindet (Dalla-Favera et al., 1983; Neri et al., 1988; Shiramizu et al., 1991; Boxer, 2001; Küppers and Dalla-Favera, 2001). Gleichzeitig legen Beobachtungen von Bruchpunktregionen in somatisch hypermutierten, rekombinierten  $V_H$ -Gensegmenten der *IG*-Gene nahe, dass der Prozess der somatischen Hypermutation DNA-Doppelstrangbrüche generiert und von diesen potentielle *MYC/IGH*-Translokationen ausgehen (s. Abbildung 5.1) (Cario et al., 2000; Papavasiliou and Schatz, 2000).



**Abbildung 5.2: Schematische Darstellung verschiedener Pathomechanismen in der Entstehung von Lymphomen.** Grüne Balken stellen Genbereiche des *IGH*-Locus dar, die roten Balken entsprechen Nicht-*IG*-Genen. Beispielhaft sind das *BCL-2*-, das *MYC*- und das *BCL-6*-Gen als Translokationspartner aufgeführt. Der Entstehungsmechanismus beim FL beruht auf einer reziproken Translokation im Verlauf der V(D)J-Rekombination. Beim BL kommt es während des Klassenwechsels in den Keimzentren zu einer Translokation mit den ‚switch regions‘ als Bruchpunktregionen. Während der somatischen Hypermutation kann es im Bereich der V(D)J-Gensegmente zu Strangbrüchen mit nachfolgender Translokation mit einem Nicht-*IG*-Gen, hier beispielhaft das *BCL-6*-Gen, kommen. Diese spielt insbesondere beim DLBCL eine wichtige Rolle (modifiziert nach Küppers and Dalla-Favera, 2001).

Beim FL wird die kodierende Sequenz des *BCL2*-Gens auf dem Chromosom 18 in die Nähe des *IGH*-Enhancers auf dem Chromosom 14 transloziert. Die Kartierung der  $t(14;18)/IGH-BCL2$  lässt darauf schließen, dass sich das Bruchereignis während der V(D)J-Rekombination im Knochenmark abgespielt hat. Zu dieser Annahme lädt ein, dass die Bruchpunkte in den Regionen der V(D)J-Gene liegen und die Bruchpunkte zudem die beim V(D)J-Rearrangement erfolgenden Insertionen von Nukleotiden enthalten (Tsujiimoto et al., 1984, 1985; Jäger et al., 2000). Obwohl diese genetischen Prozesse nach

derzeitigem Konsens im Knochenmark stattfinden, wirkt sich die  $t(14;18)/IGH-BCL2$  erst bei den Antigen-aktivierten B-Zellen, die Keimzentrumsreaktionen durchlaufen, aus. Möglicherweise besiedeln die  $t(14;18)/IGH-BCL2$  positiven Zellen die sekundären lymphatischen Gewebe und proliferieren bei Kontakt zu einem Antigen. Dort bricht die Krankheit wahrscheinlich in der Folge eines second-hit, oder mehrfachen, Ereignisses aus (s. Abbildung 5.2). Bei dessen Ausbleiben würde der Patient demgegenüber kein Lymphom entwickeln und die Zellen im Rahmen der B-Zellreifung der Apoptose zusteuern (s. Kapitel 5.2.6)(Cong et al., 2002). Durch diese zeitlich-örtlichen Abläufe lässt sich die Präsenz sporadischer  $t(14;18)/IGH-BCL2$ -positiver Zellen in gesunden Probanden erklären, die aus dem Knochenmark ausströmen und auf dem Weg in die sekundären lymphatischen Organe im Blut detektierbar sind. Eine Erklärung für das Vorkommen von kindlichen *BCR-ABL* oder *MLL* Transkripten könnte ähnlich wie beim FL sein, dass diese nicht-reifzelligen, Pro-B-Lymphozyten im Blut zirkulieren und daher durch Untersuchungen an pB nachweisbar sind.



**Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der physiologischen B-Zell-Reifung (oberer Bildabschnitt) sowie Auswirkung der Translokation  $t(14;18)/IGH-BCL2$  mit resultierender BCL-2-Überexpression beim FL (unterer Bildabschnitt).** Die  $t(14;18)/IGH-BCL2$ -positiven Zellen proliferieren bei Kontakt zu einem Antigen. Infolge des Gewinns weiterer genetischer Veränderungen während der Keimzentrumsreaktion bricht die Krankheit im Keimfollikel aus (Stein et al., 2007).

Da die  $t(8;14)/MYC-IGH$  zum Teil in den Keimzentren entsteht und die Apoptose fehlerhafter B-Zellen in den Keimzentren erfolgt, zirkulieren die  $t(8;14)/MYC-IGH$ -positiven Zellen möglicherweise gar nicht erst in der Blutbahn und könnten durch Untersuchungen im pB nicht nachweisbar sein.

Unter diesen Gesichtspunkten fiel die Auswahl der Gewebe in der Arbeit auf die Peyer Plaques, da sie den Ort von Klassenwechsel beziehungsweise somatischer Hypermutation und potentiellen Translokationsereignissen am treffendsten abbildete. Mit der Wahl der Altersklasse der gewählten Probanden war zudem die höchste Wahrscheinlichkeit für das Antreffen  $t(8;14)/MYC-IGH$ -positiver Zellen anzunehmen. Dass der Translokationszeitpunkt allerdings nicht immer mit dem Reifungsgrad der malignen B-Zelle übereinstimmen muss, konnte in anderen Studien in Mantellzelllymphomen und Plasmazellneoplasien widerlegt werden (Welzel et al., 2001; Walker et al., 2013).

#### **5.4 Interpretation des Ergebnisses unter Berücksichtigung der Eigenschaften des *MYC*-Protoonkogens**

Bis heute konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Translokation im Gesunden und einem späteren Ausbruch der Krankheit beobachtet werden (Schmitt et al., 2006). Folglich scheint beispielsweise die Translokation  $t(14;18)/IGH-BCL2$  für die Entwicklung des FL notwendig zu sein. Jedoch konnten oben genannte Untersuchungen in gesunden Individuen sowie Mausmodelle zeigen, dass die Translokation  $t(14;18)/IGH-BCL2$  allein nicht für eine maligne Transformation der Tumorzellen ausreicht (Vaux et al., 1988). Transgene Mäuse, deren Expression ihres *BCL2*-Gens dem Einfluss des *IGH*-Enhancers unterlag, entwickelten lymphatische Hyperplasien. Die Mäuse präsentierten oft erst nach langer Latenzzeit regelhaft hochmaligne Lymphome, die in der Hälfte der Fälle mit Rearrangements des *MYC*-Gens assoziiert waren (McDonnell et al., 1989; McDonnell and Korsmeyer, 1991). Im Gegensatz zum *MYC*-Protein ist das *BCL2*-Protein seiner Funktion nach ein Inhibitor der Apoptose. Auf diese Weise akkumulieren die  $t(14;18)/IGH-BCL2$ -positiven Zellen trotz ausbleibender Überlebenssignale. Entstehen funktionslose B-Zellen oder B-Zellen mit DNA-Schäden als physiologische Nebenprodukte von somatischer Hypermutation und Klassenwechsel, verhindert die Überexpression von *BCL2* deren Apoptose, sodass aller Wahrscheinlichkeit nach im Verlauf eine maligne Transformation zum FL erfolgt. In der Klinik geht die Manifestation des FL folglich mit zusätzlichen genetischen Aberrationen einher, wie die regelmäßig



vorkommenden Verluste von 1p, 6q und 17p wie auch Zugewinne in den Chromosomen X, 7, 8, 12q und (der)(18q) (Bende et al., 2006; Stein et al., 2007).

Demgegenüber konnten Boerma und Kollaboratoren zeigen, dass sich das zytogenetische Profil beim BL im Sinne einer alleinigen *MYC-IGH*-Fusion in 40% der Fälle sehr homogen darstellt. Ebenso unterschied sich das Muster der genetischen Veränderungen beim Kind nicht von dem des Erwachsenen (Boerma et al., 2008). Dies impliziert, dass der Pathomechanismus des BL ein anderer ist als der des FL. Dieser scheint nämlich unabhängig vom Alter und Alterungsprozessen, die anderen Tumoren unterliegen (Jacobs et al., 2012).

Ein weiterer Unterschied zeigte sich in Tierversuchen, wo die Lymphomgenese bei Überexpression von *Myc* einen dramatischeren Verlauf einnahm als bei Überexpression des *Bcl2*-Gens. In transgenen Mausversuchen führte die konstitutive Überexpression des Gens zur Entstehung von B-Zellneoplasien (Adams et al., 1985; Kovalchuk et al., 2000). Harris und Kollaboratoren konnten zeigen, dass die Mäuse im Mittel im Alter von 9 Wochen monoklonale Tumore entwickelten und früh verstarben. Sie vermuteten, dass das *Myc*-vermittelte Wachstum die Entstehung sekundärer genetischer Ereignisse in den Tumorzellen stärker fördere, als das *Bcl2*-Protein es tat. Hier verweilten die *t(14;18)/Igh-Bcl2*-positiven Zellen über mehrere Wochen in polyklonalen lymphatischen Hyperplasien bis zum Fortschreiten zur Malignität/Monoklonalität (Harris et al., 1988).

Als Transkriptionsfaktor reguliert das *MYC*-Protein mehrere hundert Gene, die an verschiedenen Zellprozessen wie der Regulation des Zellzyklus, des Wachstums und der Signaltransduktion beteiligt sind (Zeller et al., 2006). Entgegen des proliferativen Potentials kann eine *MYC*-Überexpression Zellen ebenso in Apoptose treiben (Evan et al., 1992). Sie ist die Folge noch nicht vollständig erschlossener Interaktionen zwischen *MYC* und der ARF-Mdm2-p53-Achse. P53 wird unter Bedingungen wie beispielsweise dem Entstehen von DNA-Schäden oder Onkogenen und dem Ausbleiben von Überlebenssignalen aktiviert. Es kann daraufhin die Progression des Zellzyklus aufheben und Apoptose induzieren (Lowe et al., 1993; Yonish-Rouach et al., 1991; Wagner et al., 1994; Mercer et al., 1990; Levine, 1997). Mdm2 kann das p53-Protein durch Ubiquitinierung und anschließendem Abbau negativ regulieren (Zhu et al., 2001). ARF kann Mdm2 inhibieren und so p53 stabilisieren (Zhang et al., 1998). In diese Achse kann *MYC* eingreifen, indem seine Expression zur Aktivierung von ARF führt (Zindy et al., 1998). Dies führt zur Inhibition von Mdm2 und auf diese Weise zur Stabilisierung von p53 mit konsekutiver p53-vermittelter Apoptose (Meyer et al., 2006). Der molekulare

Schlüssel in der Pathogenese des BL scheint in der gleichzeitigen Förderung von MYC-vermitteltem Wachstum und Proliferation sowie der Aufhebung ebenso MYC-vermittelter, proapoptotischer Mechanismen begründet zu liegen (Thorley-Lawson and Allday, 2008). Diese Beobachtung wird durch die Erkenntnis gestützt, dass in Zelllinien und Biopsien von BL Mutationen innerhalb der ARF-Mdm2-p53-Achse nachweisbar sind (Gaidano et al., 1991; Lindström et al., 2001). Im Zuge der B-Zellreifung dürften demnach zufällig *t(8;14)/MYC-IGH*-positive Zellen entstehen, die durch vom MYC-Protein vermittelte Apoptoseprozesse eliminiert werden. Möglicherweise sind weitere Mutationen notwendig, die das Gleichgewicht des hohen turn overs der *t(8;14)/MYC-IGH*-positiven Zellen in Richtung einer übermäßigen Proliferation verschieben.

Unser Ergebnis reiht sich in die Theorie ein, dass die *t(8;14)/MYC-IGH* das Schlüsselereignis bei der Genese des BL darstellt und eine *MYC*-Translokation alleine nicht zur Lymphomentstehung reicht. Nachfolgende Studien müssen Mutationsanalysen starten, um das Primärereignis des BL zu analysieren. Ein denkbare Modell wäre, mit einem ähnlich durch diese Arbeit etablierten Vier-Farb-FISH-Assay eine molekularzytogenetisch translokationsnegative Kohorte zu ermitteln, an denen weitere molekulare Profile untersucht werden können.

Wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben weisen nach neuen Erkenntnissen 70% der sBL eine konstitutive Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalwegs auf, der an einer Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen wie Zellwachstum und Zellproliferation beteiligt ist. Diese ist das Ergebnis von Mutationen, die z.B. die Aktivität des Transkriptionsfaktors *TCF3* deregulieren oder aber dessen negativen Regulator *ID3* inaktivieren (Love et al., 2012; Schmitz et al., 2012). In Arbeiten von Richter und Kollaboratoren wurden in 68% molekulargenetisch gesicherter BL Mutationen des *ID3*-Gens nachgewiesen. Möglicherweise spielen *ID3*-Mutationen eine Schlüsselrolle bei der Lymphomgenese des BL (Richter et al., 2012) und gehen einer Translokation voraus. Kommt es dann zufällig zu einer Translokation, bricht das Lymphom innerhalb einer kurzen Zeitspanne aus. Dies könnte erklären, weshalb in der vorliegenden Arbeit prämaligne BL-Zellen nicht in einem diagnostischen Zeitfenster ähnlich wie beim FL nachweisbar sind.

Auch für weitere Lymphomentitäten wie das Mantelzelllymphom oder die Plasmazellneoplasien konnte gezeigt werden, dass das Translokationsereignis zum Teil im Stadium der Progenitor-B-Zelle im Knochenmark stattfindet. Zum Krankheitsausbruch

kommt es allerdings erst im Stadium des reifen B-Lymphozyten. Dies impliziert wiederholt, dass das Translokationsereignis alleine nicht für den vollen malignen Phänotyp ausreichend ist (Welzel et al., 2001; Walker et al., 2013). Während der genetischen Rekombinationsvorgänge kommt es bisweilen zu der Ausbildung von sogenannten Nonsense-Mutationen, der Entstehung von Stoppcodons, oder Leserasterverschiebungen. Solche B-Zellen verlieren die Fähigkeit zur Ausbildung von Antikörpern. Wenn aus einer zweiten unabhängigen Umlagerung der *IG*-Gene erneut keine funktionalen Ig hervorgehen, werden diese B-Zellen bereits im Knochenmark apoptotisch eliminiert (Coupland et al., 2000b). Die Ergebnisse von Walker und Kollaboratoren könnten dadurch erklärt werden, dass die Bruchereignisse im Knochenmark stattgefunden haben und die Zellen einer erneuten B-Zellreifung untergangen sind.

Interessant wäre die Antwort auf die Fragestellung, ob in familiären Keimbahnmutationen unter Beteiligung des *ID3*-Gens vermehrt Lymphome auftreten. Die Datenbankrecherchen lassen hierauf keine Rückschlüsse zu. Ähnliche Konstellation sind beispielsweise für die aneuploide ALL mit *TP53*-Mutation beim Li-Fraumeni-Syndrom bekannt (Comeaux and Mullighan, 2017).

Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Untersuchungen zum Vorkommen sporadischer Chromosomenaberrationen in gesunden Probanden sind nicht durchgehend haltbar und zeigen teilweise erhebliche Unterschiede. Um die Assoziation zwischen dem Vorkommen sowie dem Risiko für die Entwicklung hämatologischer Neoplasien besser zu beschreiben, könnten einzelne positiv getestete Individuen in longitudinalen Studien untersucht werden.

Nicht zuletzt können immer sensitivere Verfahren bei gleichzeitig vorkommenden sporadischen Chromosomenaberrationen zu einer diagnostischen Unsicherheit im follow-up von Patienten in Remission nach einer Lymphom- oder Leukämieerkrankung führen. Denn in der angewandten Praxis werden im Rahmen der MRD-Diagnostik mittels RT-PCR Fusionstranskripte detektiert. Das Vorkommen der Fusionsprodukte gibt ein erhöhtes Risiko für das Wiederauftreten der Erkrankung wider. Die MRD-Diagnostik während einer Therapie oder während der Remission erlaubt demnach eine direkte Kontrolle über das Therapieansprechen oder den Therapiemisserfolg (Bäsecke et al., 2002). Obwohl auch die RT-PCR Artefakte und falsch-positive Ergebnisse liefern kann, bleibt die Bedeutung der MRD-Diagnostik unbestritten. Umso mehr sollten sich weitere

Untersuchungen in Richtung des sporadischen Vorkommens von Chromosomenaberrationen in Gesunden anschließen, um sie als mögliche Risikofaktoren in der Lymphomentstehung einordnen zu können.

## 5.5 Fazit

Zusammenfassend ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, die eingangs formulierte Fragestellung zu bearbeiten: Es wurde ein Vier-Farb-FISH-Assay zur Detektion der  $t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH$  Translokation etabliert und eine Kohorte von 25 kindlichen, nicht-neoplastischen Geweben auf die Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$ -Fusion hin untersucht. In keiner der analysierten Zellen aus den 17 Gewebeproben ergab sich der Hinweis auf eine  $t(8;14)/MYC-IGH$ .

Das BL ist charakterisiert durch die wiederkehrende  $t(8;14)/MYC-IGH$ -Fusion. Die Lokalisation der Bruchpunkte in den  $C_H$ -Gensegmenten der  $IGH$   $S_{\mu}$  switch-Region legt nahe, dass das Translokationsereignis in der Folge eines fehlerhaften Klassenwechsels während der Keimzentrumsreaktion stattfindet und nicht nur als Folge einer illegitimen V(D)J-Rekombination. Das zytogenetische Profil stellt sich beim BL im Sinne einer alleinigen  $MYC-IGH$ -Fusion in 40% der Fälle sehr homogen dar. Obwohl die  $t(8;14)/MYC-IGH$  für die Genese des BL notwendig scheint, kommt es wahrscheinlich erst durch den Gewinn weiterer genetischer Veränderungen zur malignen Transformation. Allerdings scheint das  $MYC$ -vermittelte Wachstum die maligne Transformation stärker zu fördern als beispielsweise eine Translokation unter Beteiligung des  $BCL2$ . Hierfür spricht das Vorkommen möglicherweise prä-maligner  $t(14;18)/IGH-BCL2$ -positiver Zellen in einem bedeutenden Anteil gesunder Probanden über längere Zeiträume ohne Fortschreiten zum Lymphom. In der Literatur findet sich lediglich eine weitere Untersuchung, die gesunde Individuen nach dem Vorhandensein prä-maligner  $t(8;14)/MYC-IGH$ -positiver Zellen untersuchte. In einer Kohorte von HIV-negativen und -positiven Männern wurde über einen Zeitraum von 12 Jahren das Vorkommen der  $t(8;14)/MYC-IGH$  im pB mittels nested PCR nachgewiesen, ohne dass diese zum BL voranschritten.

Grund für die Abwesenheit prä-maligner  $t(8;14)/IGH-BCL2$ -positiver B-Zellen in unseren Untersuchungen könnte eine zu jung gewählte Alterskohorte sein. Das FL beispielsweise konnte erst ab einem Alter von 10 Jahren im Blut gesunder Kinder nachgewiesen werden. Die Diskrepanz unseres Ergebnisses zu weiteren Untersuchungen, wo bereits im Nabelschnurblut Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden konnten, so

beispielsweise für das *BCR-ABL*-Fusionstranskript als Resultat der Translokation t(9;22) oder für Transkriptionsprodukte von *MLL*-asoziierten Translokationen, könnte in den unterschiedlichen pathomolekularen Mechanismen begründet liegen. Zum einen führen diese Aberrationen zu der Entstehung von Fusionstranskripten auf molekularer Ebene, nicht zuletzt handelt es sich bei diesen Entitäten um unreife lymphatische beziehungsweise myeloische Leukämien. Der Unterschied unserer Arbeit zu den übrigen Studien könnte aber auch in der Sensitivität der FISH-Technik gegenüber der in diesen Arbeiten angewandten PCR-Technik liegen. Außerdem lässt sich technisch nur eine um ein Vielfaches niedrigere Anzahl von Zellen am in-situ-Gewebe untersuchen (mindestens 1000 Zellen in situ) und dies könnte einen Einfluss auf die Nachweisgrenze haben. Dennoch stellt die FISH als Methode in der Diagnostik des BL den Goldstandard dar. Grund dafür sind weit verstreute Bruchpunktregionen des *MYC*-, aber auch des *IGH*-Locus.

Nicht zuletzt war eines der Ziele dieser Arbeit, die möglicherweise vorhandenen translokationspositiven Zellen funktionellen Kompartimenten direkt zuzuordnen und somit einen besseren Einblick in die Entstehung von Lymphomen gewinnen zu können.

## 5.6 Ausblick

Weitere Studien werden zeigen, welche Bedeutung der Nachweis prä-maligner, translokationspositiver Zellen im gesunden Organismus besitzt. Der Nachweis prä-maligner Zellen in der vorliegenden Arbeit hätte erlaubt, den Reifungsgrad sowie die funktionelle Lokalisation der Zellen zu bestimmen, um die Krankheitsentstehung des BL besser zu verstehen.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde eine molekularzytogenetisch translokationsnegative Kohorte von Geweben mit Anschnitten von Peyer Plaques erhalten.

Das in dieser Arbeit gewählte Studiendesign könnte Grundlage zur Untersuchung der Inzidenz weiterer sporadischer Translokationen bei Kindern sein. So existiert auch eine pädiatrische Variante des FL, die allerdings nicht die für das FL typischen Translokationspartner enthält und bisher nicht voll verstanden ist. Gehäuft wurden hier chromosomale Brüche im *IGH*, *BCL6*-Locus sowie die t(6;14)(p25;q32)/*IRF4-IGH* nachgewiesen. Die Inzidenz einer sporadischen Translokation t(6;14)*IRF4-IGH* in erwachsenen oder kindlichen gesunden Individuen in pB oder Geweben wurde unseres

Wissens nach bisher nicht untersucht. Eine solche Untersuchung in der Zukunft wäre interessant, da beide Lymphome im Kindesalter entstehen. Da in den Arbeiten zum FL im pB insbesondere erst ab einem Alter von 10 Jahren translokationspositive Zellen nachweisbar waren, würde sich hier eine Untersuchung am Gewebe wie in der hier vorliegenden Arbeit eher eignen.

Auch eine Studie zur Inzidenz t(8;14)/*MYC-IGH*-positiver Zellen in pB wäre sinnvoll, da hiermit die in dieser Arbeit genannten technischen Limitationen überwunden werden könnten. In diesem Kontext wäre ein *Whole-Genome-Sequencing* mit den neuen Sequenzierungs-Verfahren der 3. Generation wie die Nanopore-Technologie denkbar. Mittels der aktuellen Sequenzierungs-Technologien der neuen Generation (NGS) ist es möglich, kostengünstig und schnell das menschliche Genom zu sequenzieren. Die 3. Generation von Sequenzierern ermöglicht das Auslesen sehr langer Fragmente von bis zu 5 Kb, sodass die Limitationen bezüglich der Streuung von *MYC*- und *IGH*-Bruchpunkten umgangen würden.

Weiterhin wäre eine Studie der ebenfalls bei den BL charakteristischen *ID3*-Mutation anzustreben. Bis zu 68% der molekulargenetisch gesicherten BL weisen Mutationen des *ID3*-Gens auf. Möglicherweise spielen *ID3*-Mutationen eine Schlüsselrolle bei der Lymphomgenese des BL. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse könnten zu diesem Verständnis beitragen. Auch eine Mutationsanalyse des negativen Regulators von *ID3* im Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg, das *TCF3*-Gen, würde dazu beitragen, die Pathomechanismen der Lymphomentstehung und das Zusammenspiel zwischen diesen rekurrenten Mutationen und der Translokation t(8;14)/*MYC-IGH* besser zu verstehen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vier-Farb-FISH-Assay zur Detektion der Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  etabliert und eine Kohorte von 25 kindlichen, nicht-neoplastischen Geweben auf das Vorkommen einer möglicherweise prä-malignen Translokation  $t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH$ -Fusion gescreent.

Aberrante *IG*-Genumlagerungen bestimmen wesentlich die Pathophysiologie reifzelliger B-Zell-Lymphome. Die strukturellen Veränderungen umfassen Translokationen, die von Doppelstrangbrüchen als Folge von V(D)J-Rekombination, Klassenwechsel oder somatischer Hypermutation ausgehen. So ist die  $t(14;18)(q32;q21)/IGH-BCL2$  beim folliculären Lymphom (FL) und die  $t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH$  beim Burkitt-Lymphom (BL) sowie beim Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) realisiert. Durch diese Translokationen wird die kodierende Sequenz eines Protoonkogens (*BCL2* oder *MYC*) in die Region regulatorischer Komponenten des in B-Zellen konstitutiv aktiven *IG*-Gens verlagert. In der Folge kommt es zu einer Überexpression des betroffenen Protoonkogens. Als Transkriptionsfaktor reguliert das MYC-Protein mehrere hundert Gene, die an verschiedenen Zellprozessen wie der Regulation des Zellzyklus, des Wachstums und der Signaltransduktion beteiligt sind und die Zelle zur Proliferation befähigen. Allerdings müssen weitere genetische Veränderungen hinzutreten, damit es zur malignen Transformation der Zelle kommt.

Für die  $t(14;18)/IGH-BCL2$  Fusion ist bekannt, dass bis zu 54% der Gesunden diese Veränderung tragen und diese bereits ab einem Alter von 10 Jahren nachweisbar sind. Auch die  $t(8;14)/MYC-IGH$  konnte in HIV-infizierten Männern in bis zu 10% nachgewiesen werden. Um zu analysieren, ob *MYC*-Translokationen in Peyer Plaques ähnlich wie die  $t(14;18)/IGH-BCL2$  beim FL in gesunden Probanden im Zuge der B-Zell-Reifung entstehen, wurde das Vier-Farb-FISH-Assay, bestehend aus Bruchpunkt-flankierenden Sonden zur Charakterisierung der mit 75% häufigsten *MYC*-Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$ , an 25 kindlichen, nicht-neoplastischen Gewebeproben angewandt. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die Mehrheit der sporadischen BL-Fälle (nicht HIV- oder EBV-assoziiert) angeführt von der Ileozökalregion mit intraabdominellen Krankheitsmanifestationen einhergehen und die Lymphome histologisch zum Teil aus den Keimzentrums-B-Zellen in den Peyer Plaques der Ileozökalregion hervorzugehen scheinen. Ziele der Arbeit war zudem, die möglicherweise vorhandenen

translokationspositiven Zellen funktionellen Kompartimenten direkt zuordnen und somit einen besseren Einblick in die Entstehung von Lymphomen gewinnen zu können.

In keinem der 17 auswertbaren Fälle aus den 25 analysierten Fällen konnte eine Translokation beobachtet werden. Lediglich ein Fall enthielt ein fragliches Translokationsereignis, welches bei einer erneuten Hybridisierung nicht bestätigt werden konnte. Somit scheinen prä-maligne B-Zellen mit  $t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH$ -Fusion in den Peyer Plaques der Ileozökalregion gesunder Kinder und junger Erwachsener nicht vorhanden zu sein. Die Diskrepanz zu den oben genannten Studien könnte in der Sensitivität der FISH-Technik gegenüber der in diesen Arbeiten angewandten PCR-Technik liegen, aber auch die technisch um ein Vielfaches niedrigere Anzahl untersuchter Zellen am in-situ-Material könnte einen Einfluss auf die Nachweisgrenze haben. Dennoch stellt die FISH als Methode in der Diagnostik des BL den Goldstandard dar. Grund dafür sind weit verstreute Bruchpunktregionen des *MYC*-, aber auch des *IGH*-Gens, die selbst für die *Whole-Genome-Sequencing*-Verfahren der neuen Generation von Sequenzierern, welche mit bis zu 200 bp (bp für Basenpaare) Fragmenten arbeiten, eine Herausforderung darstellen.

Nicht zuletzt könnten die intrinsischen Eigenschaften des *MYC*-Proteins die Zellen zu einem raschen Fortschreiten zur Malignität befähigen, sodass das BL in seinem vollen malignen Phänotyp auftritt, ohne dass diesem ein erfassbares diagnostisches Zeitfenster für den Nachweis einer prä-malignen Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  in Gesunden vorausgeht.

Dem Vorkommen translokationspositiver Zellen in einer beträchtlichen Anzahl gesunder Probanden sollte allerdings weiter nachgegangen werden, da immer sensitivere Verfahren im Rahmen der *minimal residual disease*-Diagnostik (MRD) bei gleichzeitig vorkommenden sporadischen chromosomalen Aberrationen zu einer diagnostischen Unsicherheit in der Therapie der Lymphom- und Leukämieerkrankung führen können.



## 7 Referenzen

- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533–538.
- Bäsecke, J., Griesinger, F., Trümper, L., Brittinger, G., 2002. Leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals. *Ann. Hematol.* 81, 64–75.
- Bassing, C.H., Swat, W., Alt, F.W., 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, S45-55.
- Bende, R.J., Smit, L.A., van Noesel, C.J.M., 2006. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 21, 18–29.
- Berard, C., 1969. Histopathological definition of Burkitt's tumour. *Bull. World Health Organ.* 40, 601–607.
- Berdasco, M., Esteller, M., 2010. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev. Cell* 19, 698–711.
- Biernaux, C., Loos, M., Sels, A., Huez, G., Stryckmans, P., 1995. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood* 86, 3118–3122.
- Boerma, E.G., Siebert, R., Kluin, P.M., Baudis, M., 2008. Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. *Leukemia* 23, 225–234.
- Boxer, L.M., 2001. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Publ. Online* 10 Sept. 2001 Doi101038sjonc1204595 20.
- Brandt, P.D.B., Petrides, P.D.P.E., 2014. Grundlagen der Tumorentstehung, in: Heinrich, P.D.P.C., Müller, P.D.M., Graeve, P.D.L. (Eds.), Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, pp. 638–648.
- Bühling, K.J., Lepenies, J., Witt, K. (Eds.), 2008. Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie: [mit dem Plus im Web; Zugangscode im Buch], 4., aktualisierte Aufl. ed, Klinik. Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Burkitt, D., 1962. A Tumour Syndrome Affecting Children in Tropical Africa. *Postgrad. Med. J.* 38, 71–79.

- Caldas, C., So, C.W., MacGregor, A., Ford, A.M., McDonald, B., Chan, L.C., Wiedemann, L.M., 1998. Exon scrambling of MLL transcripts occur commonly and mimic partial genomic duplication of the gene. *Gene* 208, 167–176.
- Cario, G., Stadt, U. zur, Reiter, A., Welte, K., Sykora, K.-W., 2000. Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumour material: analysis of three cases. *Br. J. Haematol.* 110, 537–546.
- Chong, L.C., Ben-Neriah, S., Slack, G.W., Freeman, C., Ennishi, D., Mottok, A., Collinge, B., Abrisqueta, P., Farinha, P., Boyle, M., Meissner, B., Kridel, R., Gerrie, A.S., Villa, D., Savage, K.J., Sehn, L.H., Siebert, R., Morin, R.D., Gascoyne, R.D., Marra, M.A., Connors, J.M., Mungall, A.J., Steidl, C., Scott, D.W., 2018. High-resolution architecture and partner genes of MYC rearrangements in lymphoma with DLBCL morphology. *Blood Adv.* 2, 2755–2765.
- Comeaux, E.Q., Mullighan, C.G., 2017. TP53 Mutations in Hypodiploid Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7.
- Cong, P., Raffeld, M., Teruya-Feldstein, J., Sorbara, L., Pittaluga, S., Jaffe, E.S., 2002. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood* 99, 3376–3382.
- Cory, S., Jackson, J., Adams, J.M., 1980. Deletions in the constant region locus can account for switches in immunoglobulin heavy chain expression. *Nature* 285, 450–456.
- Coupland, S.E., Dallenbach, F.E., Stein, H., 2000a. Kleinzellige B-Zell-Lymphome: Differentialdiagnostische Leitlinien. *Pathol.* 21, 147–161.
- Coupland, S.E., Hummel, M., Stein, H., 2000b. Lymphatisches System und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten. *Pathol.* 21, 106–112.
- Croce, C.M., 2008. Oncogenes and Cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 502–511.
- Daley, G.Q., Etten, R.V., Baltimore, D., 1990. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247, 824–830.
- Dalla-Favera, R., Martinotti, S., Gallo, R.C., Erikson, J., Croce, C.M., 1983. Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. *Science* 219, 963–967.
- Esteller, M., 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* 8, 286–298.

- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., Hancock, D.C., 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119–128.
- Frizzera, G., Rosai, J., Dehner, L.P., Spector, B.D., Kersey, J.H., 1980. Lymphoreticular disorders in primary immunodeficiencies: new findings based on an up-to-date histologic classification of 35 cases. *Cancer* 46, 692–699.
- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M., Dalla-Favera, R., 1991. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5413–5417.
- Gascoyne, R.D., Siebert, R., Connors, J.M., 2011. Burkitt's Lymphoma, in: *Hematopathology*. Saunders, Philadelphia, US, p. Chapter 24, 391-409.e5.
- Giefing, M., Siebert, R., 2013. FISH and FICTION to Detect Chromosomal Aberrations in Lymphomas - Springer, in: Küppers, R. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R., Grosveld, G., 1984. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36, 93–99.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Harris, A.W., Pinkert, C.A., Crawford, M., Langdon, W.Y., Brinster, R.L., Adams, J.M., 1988. The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J. Exp. Med.* 167, 353–371.
- Heisterkamp, N., Knoppel, E., Groffen, J., 1988. The first BCR gene intron contains breakpoints in Philadelphia chromosome positive leukemia. *Nucleic Acids Res.* 16, 10069–10081.
- Hiom, K., Melek, M., Gellert, M., 1998. DNA Transposition by the RAG1 and RAG2 Proteins: A Possible Source of Oncogenic Translocations. *Cell* 94, 463–470.

- Hirt, C., Weitmann, K., Schüler, F., Kiefer, T., Rabkin, C.S., Hoffmann, W., Dölken, G., 2013. Circulating t(14;18)-Positive Cells in Healthy Individuals – Association with Age and Sex but not with Smoking. *Leuk. Lymphoma* 54, 2678–2684.
- Jacobs, K.B., Yeager, M., Zhou, W., Wacholder, S., Wang, Z., Rodriguez-Santiago, B., Hutchinson, A., Deng, X., Liu, C., Horner, M.-J., Cullen, M., Epstein, C.G., Burdett, L., Dean, M.C., Chatterjee, N., Sampson, J., Chung, C.C., Kovaks, J., Gapstur, S.M., Stevens, V.L., Teras, L.T., Gaudet, M.M., Albanes, D., Weinstein, S.J., Virtamo, J., Taylor, P.R., Freedman, N.D., Abnet, C.C., Goldstein, A.M., Hu, N., Yu, K., Yuan, J.-M., Liao, L., Ding, T., Qiao, Y.-L., Gao, Y.-T., Koh, W.-P., Xiang, Y.-B., Tang, Z.-Z., Fan, J.-H., Aldrich, M.C., Amos, C., Blot, W.J., Bock, C.H., Gillanders, E.M., Harris, C.C., Haiman, C.A., Henderson, B.E., Kolonel, L.N., Le Marchand, L., McNeill, L.H., Rybicki, B.A., Schwartz, A.G., Signorello, L.B., Spitz, M.R., Wiencke, J.K., Wrensch, M., Wu, X., Zanetti, K.A., Ziegler, R.G., Figueroa, J.D., Garcia-Closas, M., Malats, N., Marenne, G., Prokunina-Olsson, L., Baris, D., Schwenn, M., Johnson, A., Landi, M.T., Goldin, L., Consonni, D., Bertazzi, P.A., Rotunno, M., Rajaraman, P., Andersson, U., Freeman, L.E.B., Berg, C.D., Buring, J.E., Butler, M.A., Carreon, T., Feychting, M., Ahlbom, A., Gaziano, J.M., Giles, G.G., Hallmans, G., Hankinson, S.E., Hartge, P., Henriksson, R., Inskip, P.D., Johansen, C., Landgren, A., McKean-Cowdin, R., Michaud, D.S., Melin, B.S., Peters, U., Ruder, A.M., Sesso, H.D., Severi, G., Shu, X.-O., Visvanathan, K., White, E., Wolk, A., Zeleniuch-Jacquotte, A., Zheng, W., Silverman, D.T., Kogevinas, M., Gonzalez, J.R., Villa, O., Li, D., Duell, E.J., Risch, H.A., Olson, S.H., Kooperberg, C., Wolpin, B.M., Jiao, L., Hassan, M., Wheeler, W., Arslan, A.A., Bueno-de-Mesquita, H.B., Fuchs, C.S., Gallinger, S., Gross, M.D., Holly, E.A., Klein, A.P., LaCroix, A., Mandelson, M.T., Petersen, G., Boutron-Ruault, M.-C., Bracci, P.M., Canzian, F., Chang, K., Cotterchio, M., Giovannucci, E.L., Goggins, M., Bolton, J.A.H., Jenab, M., Khaw, K.-T., Krogh, V., Kurtz, R.C., McWilliams, R.R., Mendelsohn, J.B., Rabe, K.G., Riboli, E., Tjønneland, A., Tobias, G.S., Trichopoulos, D., Elena, J.W., Yu, H., Amundadottir, L., Stolzenberg-Solomon, R.Z., Kraft, P., Schumacher, F., Stram, D., Savage, S.A., Mirabello, L., Andrulis, I.L., Wunder, J.S., García, A.P., Sierrasesúmaga, L., Barkauskas, D.A., Gorlick, R.G., Purdue, M., Chow, W.-H., Moore, L.E., Schwartz, K.L., Davis, F.G., Hsing, A.W., Berndt, S.I., Black, A., Wentzensen, N., Brinton, L.A., Lissowska, J., Peplonska, B., McGlynn, K.A., Cook, M.B., Graubard, B.I., Kratz, C.P., Greene, M.H., Erickson, R.L., Hunter, D.J., Thomas, G., Hoover, R.N., Real, F.X., Fraumeni Jr, J.F., Caporaso, N.E., Tucker, M., Rothman, N., Pérez-Jurado, L.A., Chanock, S.J., 2012. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat. Genet.* 44, 651–658.

- Jaffe, E.S., Pittaluga, S., 2011. Aggressive B-Cell Lymphomas: A Review of New and Old Entities in the WHO Classification. *ASH Educ. Program Book 2011*, 506–514.
- Jäger, U., Böcskör, S., Le, T., Mitterbauer, G., Bolz, I., Chott, A., Kneba, M., Mannhalter, C., Nadel, B., 2000. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood* 95, 3520–3529.
- Janz, S., Potter, M., Rabkin, C.S., 2003. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes. Chromosomes Cancer* 36, 211–223.
- Joos, S., Falk, M.H., Lichter, P., Haluska, F.G., Henglein, B., Lenoir, G.M., Bornkamm, G.W., 1992. Variable breakpoints in Burkitt lymphoma cells with chromosomal t(8;14) translocation separate c-myc and the IgH locus up to several hundred kb. *Hum. Mol. Genet.* 1, 625–632.
- Joos, Stefan, Haluska, F.G., Falk, M.H., Henglein, B., Hameister, H., Croce, C.M., Bornkamm, G.W., 1992. Mapping Chromosomal Breakpoints of Burkitt's t(8;14) Translocations Far Upstream of c-myc. *Cancer Res.* 52, 6547–6552.
- Kaplan, M.A., Ferry, J.A., Harris, N.L., Jacobson, J.O., 1994. Clonal analysis of posttransplant lymphoproliferative disorders, using both episomal Epstein-Barr virus and immunoglobulin genes as markers. *Am. J. Clin. Pathol.* 101, 590–596.
- Kovalchuk, A.L., Qi, C.-F., Torrey, T.A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S.S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G.W., Janz, S., Morse, H.C., 2000. Burkitt Lymphoma in the Mouse. *J. Exp. Med.* 192, 1183–1190.
- Küppers, R., Dalla-Favera, R., 2001. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Publ. Online* 10 Sept. 2001 Doi101038sjonc1204640 20.
- Kurzrock, R., Kantarjian, H.M., Druker, B.J., Talpaz, M., 2003. Philadelphia ChromosomePositive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Ann. Intern. Med.* 138, 819.
- Levine, A.J., 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Levine, A.M., 1992. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma [see comments]. *Blood* 80, 8–20.
- Limpens, J., de Jong, D., van Krieken, J.H., Price, C.G., Young, B.D., van Ommen, G.J., Kluin, P.M., 1991. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular

hyperplasia. *Oncogene* 6, 2271–2276.

Lindström, M., Klangby, U., Wiman, K., 2001. p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53. *Publ. Online* 20 April 2001 Doi101038sjonc1204303 20.

Liu, C.P., Tucker, P.W., Mushinski, J.F., Blattner, F.R., 1980. Mapping of heavy chain genes for mouse immunoglobulins M and D. *Science* 209, 1348–1353.

Liu, Q., Salaverria, I., Pittaluga, S., Jegalian, A.G., Xi, L., Siebert, R., Raffeld, M., Hewitt, S.M., Jaffe, E.S., 2013. Follicular Lymphomas in children and young adults: A comparison of the pediatric variant with usual follicular lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 333–343.

Love, C., Sun, Z., Jima, D., Li, G., Zhang, J., Miles, R., Richards, K.L., Dunphy, C.H., Choi, W.W.L., Srivastava, G., Lugar, P.L., Rizzieri, D.A., Lagoo, A.S., Bernal-Mizrachi, L., Mann, K.P., Flowers, C.R., Naresh, K.N., Evens, A.M., Chadburn, A., Gordon, L.I., Czader, M.B., Gill, J.I., Hsi, E.D., Greenough, A., Moffitt, A.B., McKinney, M., Banerjee, A., Grubor, V., Levy, S., Dunson, D.B., Dave, S.S., 2012. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat. Genet.* 44, 1321–1325.

Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T., 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847–849.

Lüllmann-Rauch, R., 2009. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen, 3., vollst. überarb. Aufl. ed. Thieme, Stuttgart New York, NY.

Magrath, I., 1990. The Pathogenesis of Burkitt's Lymphoma, in: Klein, G.F.V.W. and G. (Ed.), *Advances in Cancer Research*. Academic Press, pp. 133–270.

Magrath, I.T., Sariban, E., 1985. Clinical features of Burkitt's lymphoma in the USA. *IARC Sci. Publ.* 119–127.

Maria Murga Penas, E., Schilling, G., Behrmann, P., Klokow, M., Vettorazzi, E., Bokemeyer, C., Dierlamm, J., 2014. Comprehensive cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of 44 Burkitt lymphoma cell lines: secondary chromosomal changes characterization, karyotypic evolution, and comparison with primary samples. *Genes. Chromosomes Cancer* 53, 497–515.

McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., Korsmeyer, S.J., 1989. bcl-2-Immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57, 79–88.

- McDonnell, T.J., Korsmeyer, S.J., 1991. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). *Nature* 349, 254–256.
- Mercer, W.E., Shields, M.T., Amin, M., Sauve, G.J., Appella, E., Romano, J.W., Ullrich, S.J., 1990. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6166–6170.
- Meyer, N., Kim, S.S., Penn, L.Z., 2006. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin. Cancer Biol.*, 25 years of the c-Myc oncogene 16, 275–287.
- Müller, J.R., Janz, S., Goedert, J.J., Potter, M., Rabkin, C.S., 1995. Persistence of immunoglobulin heavy chain/c-myc recombination-positive lymphocyte clones in the blood of human immunodeficiency virus-infected homosexual men. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6577–6581.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C.M., Canaani, E., 2002. ALL-1 Is a Histone Methyltransferase that Assembles a Supercomplex of Proteins Involved in Transcriptional Regulation. *Mol. Cell* 10, 1119–1128.
- Neri, A., Barriga, F., Knowles, D.M., Magrath, I.T., Dalla-Favera, R., 1988. Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 2748–2752.
- Nilson, I., LöCHNER, K., Siegler, G., Greil, J., Beck, J.D., Fey, G.H., Marschalek, R., 1996. Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br. J. Haematol.* 93, 966–972.
- Nowell, P.C., Hungerford, D.A., 1962. Chromosome studies in human leukemia. IV. Myeloproliferative syndrome and other atypical myeloid disorders. *J. Natl. Cancer Inst.* 29, 911–931.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., Baltimore, D., 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517–1523.
- Oschlies, I., Salaverria, I., Mahn, F., Meinhardt, A., Zimmermann, M., Woessmann, W., Burkhardt, B., Gesk, S., Krams, M., Reiter, A., Siebert, R., Klapper, W., 2010. Pediatric

follicular lymphoma – a clinico-pathological study of a population-based series of patients treated within the Non-Hodgkin's Lymphoma - Berlin-Frankfurt-Münster (NHL-BFM) multicenter trials. *Haematologica* 95, 253–259.

Oschlies, P.D.I., Klapper, W., 2014. Maligne Lymphome im Kindes- und Jugendalter. *Pathol.* 35, 383–398.

Papavasiliou, F.N., Schatz, D.G., 2000. Cell-cycle-regulated DNA double-strand breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* 408, 216–221.

Rajewsky, K., 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751–758.

Rassow, J. (Ed.), 2008. *Biochemie: 50 Tabellen, 2., aktualisierte Aufl. ed, Duale Reihe.* Thieme, Stuttgart.

Richter, J., Schlesner, M., Hoffmann, S., Kreuz, M., Leich, E., Burkhardt, B., Rosolowski, M., Ammerpohl, O., Wagener, R., Bernhart, S.H., Lenze, D., Szczepanowski, M., Paulsen, M., Lipinski, S., Russell, R.B., Adam-Klages, S., Apic, G., Claviez, A., Hasenclever, D., Hovestadt, V., Hornig, N., Korbel, J.O., Kube, D., Langenberger, D., Lawerenz, C., Lisfeld, J., Meyer, K., Picelli, S., Pischmarov, J., Radlwimmer, B., Rausch, T., Rohde, M., Schilhabel, M., Scholtysik, R., Spang, R., Trautmann, H., Zenz, T., Borkhardt, A., Drexler, H.G., Möller, P., MacLeod, R.A.F., Pott, C., Schreiber, S., Trümper, L., Loeffler, M., Stadler, P.F., Lichter, P., Eils, R., Küppers, R., Hummel, M., Klapper, W., Rosenstiel, P., Rosenwald, A., Brors, B., Siebert, R., ICGC MMML-Seq Project, 2012. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat. Genet.* 44, 1316–1320.

Roulland, S., Navarro, J.-M., Grenot, P., Milili, M., Agopian, J., Montpellier, B., Gauduchon, P., Lebailly, P., Schiff, C., Nadel, B., 2006. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* 203, 2425–2431.

Rowe, M., Kelly, G.L., Bell, A.I., Rickinson, A.B., 2009. Burkitt's lymphoma: The Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology. *Semin. Cancer Biol.* 19, 377–388.

Sariban, E., Edwards, B., Janus, C., Magrath, I., 1983. Central nervous system involvement in American Burkitt's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 1, 677–681.

Schlegelberger, B., Metzke, S., Harder, S., Zühlke-Jenisch, R., Zhang, Y., Siebert, R., 1999.



Classical and molecular cytogenetics of tumor cells, in: Diagnostic Cytogenetics. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. p151-185.

Schmitt, C., Balogh, B., Grundt, A., Buchholtz, C., Leo, A., Benner, A., Hensel, M., Ho, A.D., Leo, E., 2006. The bcl-2/IgH rearrangement in a population of 204 healthy individuals: Occurrence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity. *Leuk. Res.* 30, 745–750.

Schmitz, R., Young, R.M., Ceribelli, M., Jhavar, S., Xiao, W., Zhang, M., Wright, G., Shaffer, A.L., Hodson, D.J., Buras, E., Liu, X., Powell, J., Yang, Y., Xu, W., Zhao, H., Kohlhammer, H., Rosenwald, A., Kluin, P., Müller-Hermelink, H.K., Ott, G., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Olgwang, M.D., Reynolds, S.J., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Tubbs, R.R., Cook, J.R., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., Pittaluga, S., Wilson, W., Waldmann, T.A., Rowe, M., Mbulaiteye, S.M., Rickinson, A.B., Staudt, L.M., 2012. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490, 116–120.

Schüler, F., Dölken, L., Hirt, C., Kiefer, T., Berg, T., Fusch, G., Weitmann, K., Hoffmann, W., Fusch, C., Janz, S., Rabkin, C.S., Dölken, G., 2009. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 124, 958–963.

Shiramizu, B., Barriga, F., Neequaye, J., Jafri, A., Dalla-Favera, R., Neri, A., Gutierrez, M., Levine, P., Magrath, I., 1991. Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood* 77, 1516–1526.

Siebert, R., Matthiesen, P., Harder, S., Zhang, Y., Borowski, A., Zühlke-Jenisch, R., Metzke, S., Joos, S., Weber-Matthiesen, K., Grote, W., Schlegelberger, B., 1998. Application of Interphase Fluorescence In Situ Hybridization for the Detection of the Burkitt Translocation t(8;14)(q24;q32) in B-Cell Lymphomas. *Blood* 91, 984–990.

Song, J., Mercer, D., Hu, X., Liu, H., Li, M.M., 2011. Common Leukemia- and Lymphoma-Associated Genetic Aberrations in Healthy Individuals. *J. Mol. Diagn. JMD* 13, 213–219.

Stein, P.D.H., Hummel, M., Jöhrens, K., Anagnostopoulos, I., 2007. Klassifikation und Pathogenese der malignen Lymphome. *Internist* 48, 351–361.

Summers, K.E., Goff, L.K., Wilson, A.G., Gupta, R.K., Lister, T.A., Fitzgibbon, J., 2001.

- Frequency of the Bcl-2/IgH Rearrangement in Normal Individuals: Implications for the Monitoring of Disease in Patients With Follicular Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 19, 420–424.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W., 2008. WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed. IARC Press, Lyon, France.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., Jaffe, E.S., 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390.
- Thorley-Lawson, D.A., Allday, M.J., 2008. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 913–924.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M., 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097–1099.
- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M., 1985. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229, 1390–1393.
- Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M., 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442.
- Ventura, R.A., Martin-Subero, J.I., Jones, M., McParland, J., Gesk, S., Mason, D.Y., Siebert, R., 2006. FISH Analysis for the Detection of Lymphoma-Associated Chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin-Embedded Tissue. *J. Mol. Diagn. JMD* 8, 141–151.
- Wagner, A.J., Kokontis, J.M., Hay, N., 1994. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev.* 8, 2817–2830.
- Walker, B.A., Wardell, C.P., Johnson, D.C., Kaiser, M.F., Begum, D.B., Dahir, N.B., Ross, F.M., Davies, F.E., Gonzalez, D., Morgan, G.J., 2013. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood* 121, 3413–3419.
- Welzel, N., Le, T., Marculescu, R., Mitterbauer, G., Chott, A., Pott, C., Kneba, M., Du, M.-Q., Kusec, R., Drach, J., Raderer, M., Mannhalter, C., Lechner, K., Nadel, B., Jaeger, U., 2001. Templated Nucleotide Addition and Immunoglobulin JH-Gene Utilization in t(11;14)

Junctions: Implications for the Mechanism of Translocation and the Origin of Mantle Cell Lymphoma. *Cancer Res.* 61, 1629–1636.

Willis, T.G., Dyer, M.J.S., 2000. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 96, 808–822.

Wright, D., McKeever, P., Carter, R., 1997. Childhood non-Hodgkin lymphomas in the United Kingdom: findings from the UK Children's Cancer Study Group. *J. Clin. Pathol.* 50, 128–134.

Yin, C.C., Luthra, R., 2013. Molecular detection of t(14;18)(q32;q21) in follicular lymphoma. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 999, 203–209.

Yonish-Rouach, E., Resnftzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., Oren, M., 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345–347.

Zeidler, R., Joos, S., Delecluse, H.J., Klobeck, G., Vuillaume, M., Lenoir, G.M., Bornkamm, G.W., Lipp, M., 1994. Breakpoints of Burkitt's lymphoma t(8;22) translocations map within a distance of 300 kb downstream of MYC. *Genes. Chromosomes Cancer* 9, 282–287.

Zhang, Y., Xiong, Y., Yarbrough, W.G., 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92, 725–734.

Zhu, Q., Yao, J., Wani, G., Wani, M.A., Wani, A.A., 2001. Mdm2 Mutant Defective in Binding p300 Promotes Ubiquitination but Not Degradation of p53 EVIDENCE FOR THE ROLE OF p300 IN INTEGRATING UBIQUITINATION AND PROTEOLYSIS. *J. Biol. Chem.* 276, 29695–29701.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., Roussel, M.F., 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 12, 2424–2433.

## **8 DANKSAGUNG**

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Reiner Siebert für die Übernahme als Doktorandin sowie für das interessante Dissertationsthema bedanken.

Bei Frau PD Dr. Eva Maria Murga Penas und Frau Dr. Inga Nagel möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung und für deren Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Beantwortung inhaltlicher sowie methodischer Fragen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Klapper gilt außerdem mein ganz besonderer Dank für seine inhaltlichen Anregungen und für die Auswahl des histologischen Materials. Außerdem danke ich Frau Charlotte Botz-von-Drathen für die mühevollen Arbeit bei der Verfügungstellung des histologischen Materials.

Für Ihre große Hilfsbereitschaft und für die aufgewandte Mühe und Kraft bei der Zweitsicht der Präparate danke ich ganz besonders Frau Ingrid Vollmer.

Meiner Familie, die immer für mich da war, gilt mein herzlichster Dank.

## 9 PUBLIKATION

### Screening of non-neoplastic lymphatic tissues from children for the *IGH-MYC* fusion using a highly sensitive 4-color FISH-assay

**Pelin Kurnaz<sup>1</sup>, Shaymaa ElGafaary<sup>1,2</sup>, Inga Nagel<sup>1,3</sup>, Wolfram Klapper<sup>4</sup>, Reiner Siebert<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Germany; <sup>2</sup>Institute of Human Genetics, University of Ulm, Ulm, Germany, <sup>3</sup>Institute of Clinical Pharmacology, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Germany; <sup>4</sup>Section Haematopathology and Lymph Node Registry, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Germany

Burkitt lymphoma is a mature B-cell lymphoma which on the genetic level is characterized by the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) juxtaposing the *IGH* locus in 14q32 next to the *MYC* locus in 8q24. In a minor part of Burkitt lymphomas, immunoglobulin light chain variants of the translocation result in overexpression of *MYC*. Despite being pathognomonic for Burkitt lymphoma, the *IG-MYC* juxtaposition alone is not sufficient on its own for a malignant transformation of the cell. Other *IGH* rearrangements like the *IGH-BCL2* fusion, typical for follicular lymphoma, were detected in a significant number of healthy individuals. For the *IGH-MYC* translocation, only scarce data in healthy individuals exist. This is most likely due to scattering of the breakpoints which are far more difficult to target by PCR than the *IGH-BCL2* translocation. Therefore, we aimed at investigating if *MYC*-translocation positive cells can also be detected in normal B-cell maturation. Considering the epidemiology of Burkitt lymphoma being the most common B-cell lymphoma in children, we focused on samples from young individuals. On the one hand, we analyzed non-neoplastic tissue specimen of bone marrow (n=14) (age range 3-18, median age 8.5 years) and lymph nodes (n=19)(age range 2-18 years, median age 12 years). On the other hand, considering the typical clinical presentation of Burkitt lymphoma, we included non-neoplastic tissue specimen containing Peyer Patches (n=25)(age range 48 hours-20 years, median age 17 years). The specimen were analyzed using a four-color fluorescence in situ hybridisation (FISH) assay with probes flanking the breakpoints on chromosomes 8 and 14. In this setting, a positive result comprised the break on both chromosomes (seen as signal split for each locus) and fusion of the involved genes (leading to two different fusion signals).

The assay was first validated on controls of cells with a normal male karyotype from healthy individuals as well as on five Burkitt cell lines and each five FFPE embedded t(8;14) negative and positive tissues as negative and positive controls. The assay was then applied for the screening of a *IGH-MYC* fusion in the above mentioned paraffin-embedded tissues. Successful hybridizations of overall 9, 15 and 17 FFPE sections from bone marrow, lymph nodes and Peyer Patches respectively could be obtained. A translocation t(8;14)(q24;q32) was not detectable in any of the investigated tissues.

With the established assay we were able to provide a highly sensitive tool for the detection of the translocation t(8;14)(q24;q32). However, we did not detect normal B-cells carrying this translocation. This does not exclude that such cells exist. Alternatively, the growth advantage conferred by *MYC* may promote the acquisition of secondary genetic changes. This may result in a rapid tumorigenesis that if occurring these cells only present as full blown Burkitt lymphoma.

(als Postervorstellung für die 28.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik; [http://www.gfhev.de/de/kongress/009\\_Abstractband\\_gesamt.pdf](http://www.gfhev.de/de/kongress/009_Abstractband_gesamt.pdf))

## **10 ERKLÄRUNG**

Ich, Pelin Kurnaz, erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist und ohne die unzulässige Hilfe Dritter entstanden ist.

---

Datum

Unterschrift